
Mestrado Integrado em Engenharia Química

Estudo comparativo da cristalização de lisozima num tanque agitado e num RFO-CSP

Dissertação de Mestrado

de

Carmen Sandra Gomes Mila

Desenvolvida no âmbito da unidade curricular de Dissertação

realizado em

LEPABE - Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente, Biotecnologia e
Energia

Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto



Orientador na FEUP: Doutora Filipa Juliana Fernandes Castro

Co-orientador na FEUP: Doutor Fernando Alberto Nogueira da Rocha



Departamento de Engenharia Química

fevereiro de 2019

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer aos meus orientadores, Filipa Juliana Fernandes Castro e ao Professor Fernando Alberto Nogueira da Rocha, por partilharem comigo o seu vasto conhecimento. Agradeço, ainda, a total disponibilidade e dedicação ao longo destes meses de trabalho.

Gostaria de agradecer aos meus pais, Luís Mila e Carmen Mila, e aos meus irmãos Carla Mila, Rui Mila e Luís Pedro Mila, pelo apoio ao longo da minha vida, sem eles não poderia chegar a lugar algum.

As minhas grandes amigas Elisabete Ferreira, Milena Centeno e Géssika Morgado que estiveram sempre comigo neste meu percurso na Universidade do Porto.

Aos colegas de laboratório, Anabela, Antónia, Andreia, Carolina, Cecília, Filipe e Patrícia, pelas conversas, disponibilidade, ajudas prestadas e por terem tornado este período muito mais alegre.

Este trabalho foi financiado por: Unidade de Investigação UID/EQU/00511/2019 - Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente, Biotecnologia e Energia - LEPABE - financiado por fundos nacionais através da FCT/MCTES (PIDDAC);

- (i) POCI-01-0145-FEDER-016816, financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER), através do COMPETE2020 - Programa Operacional Competitividade e Internacionalizações (POCI) e com o apoio financeiro da FCT/MCTES através de fundos nacionais (PIDDAC);
- (ii) Projeto “LEPABE-2-ECO-INNOVATION”, com a referência NORTE-01-0145-FEDER-000005, cofinanciado pelo Programa Operacional Regional do Norte (NORTE 2020), através do Portugal 2020 e do Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER).

Resumo

A cristalização de proteínas, sendo mais conhecida para a determinação da estrutura tridimensional de proteínas por cristalografia de raios-X, também representa uma alternativa altamente seletiva e rentável de purificação de proteínas. No entanto, a cristalização de proteínas é um processo desafiante que envolve a otimização de múltiplas variáveis e que deve ter em consideração critérios como o tamanho e distribuição de tamanho, rendimento e pureza dos cristais, características particularmente relevantes no que diz respeito aos processos a jusante e à qualidade do produto.

O presente trabalho tem por objetivo comparar o desempenho de um tanque agitado e de um reator de fluxo oscilatório com constrições suaves de parede (RFO-CSP) na cristalização de uma proteína modelo, a lisozima.

Numa primeira parte foi estudado o efeito da concentração inicial e da velocidade de agitação na cristalização de lisozima num tanque agitado em regime *batch*. Para tal avaliou-se os perfis de concentração de lisozima ao longo do tempo, o rendimento e as características dos cristais (morfologia e tamanho típico). Constatou-se que para as condições estudadas a agitação não tem uma influência significativa no processo de cristalização. Relativamente ao aumento da concentração inicial de lisozima, este leva à formação de um maior número de cristais e a um maior rendimento. Ao fim de 20 horas, o tamanho típico dos cristais era de 36 μm e 32 μm e o rendimento de 25% e 95%, para a concentração de lisozima inicial de 25 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e 50 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respetivamente. Os resultados sugerem ainda a ocorrência de nucleação heterógena e no caso da concentração inicial de lisozima mais elevada há ocorrência de nucleação secundária.

No RFO-CSP, também operado em regime *batch*, foi utilizada a concentração inicial de 50 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e estudaram-se duas amplitudes, 1,0 mm e 2,0 mm, para uma frequência de 5 Hz. Para as duas amplitudes estudadas, o tamanho típico dos cristais é próximo, sendo de 38 e 34 μm para x_0 de 1 e 2 mm, respetivamente. Quanto ao rendimento, este foi de 50 e 74% para x_0 de 1 e 2 mm, respetivamente. À semelhança do tanque agitado, os resultados indicam que provavelmente ocorreu nucleação heterogénea e secundária.

Nas condições experimentais estudadas, os resultados no tanque agitado e no RFO-CSP são muito semelhantes em termos de morfologia e tamanho típico dos cristais formados.

Palavras Chave:

cristalização de proteínas; tanque agitado; velocidade de agitação; RFO-CSP; amplitude de oscilação

Abstract

Protein crystallization, being known as a method of determination of the protein's tridimensional structure by x-ray crystallography, it represents a highly selective and profitable alternative to purify proteins. However, protein crystallization is a challenging process, which involves the optimization of multiple parameters and must have in consideration some standards such as dimensions and size distributions, yield and crystal purity. These characteristics are particularly relevant regarding downstream processes and product quality.

The present dissertation aims to compare the performance of a stirred tank and an oscillatory flow reactor with periodic constrictions (OFR-SPC) in the crystallization of a model protein, which is lysozyme.

In a first part, the effect of an initial concentration and agitation speed on the crystallization of lysozyme in a batch stirred tank was studied. For this purpose, the concentration profiles of lysozyme over time, the yield and characteristics of the crystals (morphology and typical size) were evaluated.

It has been observed that, for the studied conditions, the stirring does not have a significant influence on the crystallization process. Regarding the increase in the initial concentration of lysozyme, this leads to the formation of a greater amount of crystals and a higher yield.

After 20 hours, the typical size of the crystals was around 36 and 32 μm and the yield was between 25 and 95% for an initial concentration of lysozyme of 25 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and 50 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. The results suggest the occurrence of a heterogeneous nucleation and in the case of a higher initial concentration of lysozyme, the occurrence of a secondary nucleation.

An initial concentration of 50 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ was utilized in the OFR-SPC, also in batch regimen and two amplitudes, 1,0 and 2,0 mm, were studied to a frequency of 5 Hz. For both amplitudes, the typical size of the crystals are concordant, being 38 and 34 μm respectively. Relatively to the yield, 50 and 74% were obtained to x_0 of 1 and 2 mm, respectively. As with the stirred tank, the results indicate that heterogeneous and secondary nucleation probably occurred.

Under the experimental conditions, the results of the stirred tank case and the OFR-SPC case are very similar in terms of morphology and typical sizing of the formed crystals.

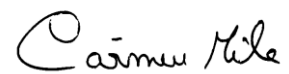
Keywords:

protein crystallization; stirred tank; stirrer speed; OFR-SPC; amplitude of oscillation

Declaração

Declara, sob compromisso de honra, que este trabalho é original e que todas as contribuições não originais foram devidamente referenciadas com identificação da fonte.

11 de fevereiro de 2019

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Carmen Mila'.

(Carmen Mila)

Índice

1	Introdução.....	1
1.1	Enquadramento e Apresentação do Projeto	1
1.2	Organização da Tese	2
2	Fundamentos da cristalização de proteínas	4
2.1	Termodinâmica da cristalização das proteínas.....	4
2.1.1	Pureza da proteína.....	4
2.1.2	Solubilidade e sobressaturação	4
2.1.3	Variáveis que afetam a solubilidade das proteínas	5
2.1.4	Diagrama de fases.....	6
2.2	Cinética da cristalização de proteínas	7
2.2.1	Nucleação	7
	Nucleação primária homogénea	7
	Nucleação primária heterogénea.....	11
	Nucleação secundária	11
2.2.2	Crescimento.....	11
	Cinética de crescimento	12
3	Design do processo	14
3.1	Métodos de gerar sobressaturação	14
3.2	Screening e otimização das condições de cristalização	14
3.3	Cristalizadores e Agitadores	15
3.3.1	Tanque com e sem agitação	15
3.3.2	Cristalizadores tubulares	16
3.3.3	Cristalizadores de fluxo oscilatório	16
3.4	Modo de operação	18
3.5	Scale-up.....	19
4	Materiais e Métodos	20
4.1	Materiais	20

4.2	Instalação experimental	20
4.2.1	Tanque Agitado	20
4.2.2	RFO-CSP	21
4.3	Caracterização dos cristais	22
4.4	Rendimento	22
5	Resultados e Discussão	23
5.1	Ensaio de solubilidade	23
5.2	Tanque agitado	24
5.2.1	Perfil de concentração da lisozima	25
5.2.2	Morfologia e tamanho dos cristais	27
5.2.3	Rendimento	36
5.3	RFO-CSP	38
5.3.1	Tamanho dos cristais	38
5.3.2	Rendimento	39
5.4	Comparação entre o desempenho do tanque agitado e do RFO-CSP	40
6	Conclusões	42
7	Avaliação do trabalho realizado	43
7.1	Objetivos Realizados	43
7.2	Apreciação Final	43
8	Referências	44
	Anexo A - Solubilidade da lisozima	49
	Anexo B - Perfis de concentração	50
	Anexo C - Tamanho dos cristais no tanque agitado	53
	Anexo D - Ondas Sinusoidais	59
	Anexo E - Concentração e rendimento no RFO-CSP	60
	Anexo F - Suspensão da solução no RFO-CSP	61
	Anexo G - Rendimento Tanque agitado para 203 minutos	65

Notação e Glossário

A	Área de superfície do núcleo	m^2
a	Atividade numa solução sobressaturada	
A	Fator pré-exponencial	$m \cdot kg^g \cdot s^{-1} \cdot g^{-g}$
a_s	Atividade numa solução saturada	
C	Concentração de proteína em solução	$g \cdot L^{-1}$
C_f	Concentração final de lisozima	$g \cdot L^{-1}$
C_i	Concentração inicial de lisozima	$g \cdot L^{-1}$
C_l^*	Concentração de lisozima no equilíbrio	$g \cdot L^{-1}$
$C_{lisozima}$	Concentração de cloreto de sódio	% (p/v)
C_{NaCl}	Concentração de lisozima	$g \cdot L^{-1}$
C_s	Concentração de proteína no equilíbrio	$g \cdot L^{-1}$
D	Coefficiente de difusão	$m^2 \cdot s^{-1}$
d	Diâmetro da molécula de soluto	μm
D	Diâmetro interno do tubo	mm
d	Diâmetro interno do tubo	mm
d_0	Diâmetro interno do tubo nas constrições	mm
d_{ow}	Diâmetro interno da constrição	mm
d_{ow}	Diâmetro interno do tubo nas constrições	mm
D_w	Diâmetro interno do tubo	mm
f	Frequência de oscilação	s^{-1}
g	Ordem do processo de crescimento global	
J	Velocidade de nucleação	$s^{-1} \cdot L^{-1}$
k	Constante de Boltzman	$J \cdot K^{-1}$
K_G	Coefficiente global de crescimento do cristal	$m \cdot kg^g \cdot s^{-1} \cdot g^{-g}$
k_m	Coefficiente de transferência de massa	$m \cdot s^{-1}$
k_n'	Constante de velocidade de nucleação secundária	$m \cdot kg^g \cdot s^{-1} \cdot g^{-g}$
k_r	Coefficiente de integração na superfície	$m \cdot kg^g \cdot s^{-1} \cdot g^{-g}$
L	Espaço médio entre constrições sucessivas	m
L_1	Comprimento da constrição	m
L_2	Comprimento do tubo sem constrição	m
m	Massa de um único cristal	g
MF	Fator de maior influência	
R	Constante dos gases perfeitos	$J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$
r	Raio do embrião	m
r^*	Raio crítico	m
R_c	Raio interno de curvatura da parede lateral da seção convergente	m

R_d	Raio de curvatura da parede lateral da subsecção divergente	m
Re_n	Número de Reynolds de escoamento	
Re_o	Número de Reynolds oscilatório	
S	Sobressaturação	
St	Número de Strouhal	
T	Temperatura	K
u	Velocidade média superficial	$m \cdot s^{-1}$
V	Volume do núcleo	m^3
V_M	Volume de uma molécula de soluto	$m^3 \cdot molécula^{-1}$
w	Frequência de oscilação	s^{-1}
x_0	Amplitude de oscilação	mm

Letras gregas

α	Coeficiente de extinção	$mL^{-1} \cdot mg^{-1} \cdot cm^{-1}$
γ	Coeficiente de atividade	
γ^*	Coeficiente de atividade no equilíbrio	
ΔG	Variação de energia livre de Gibbs total	J
ΔG^*	Variação máxima de energia livre de Gibbs na nucleação primária homogénea	J
$\Delta G^{*'}$	Variação máxima de energia livre de Gibbs na nucleação primária heterogénea	J
ΔG_A	Variação de energia livre de Gibbs de área de superfície	J
ΔG_v	Variação de energia livre de Gibbs de volume	J
θ	Ângulo de contacto entre o sólido e o líquido	°
μ	Potencial químico numa solução sobressaturada	$J \cdot mol^{-1}$
μ_0	Potencial químico padrão	$J \cdot mol^{-1}$
μ_s	Potencial químico numa solução saturada	$J \cdot mol^{-1}$
σ	Tensão superficial	$J \cdot m^{-2}$
ν	Viscosidade cinemática do fluido	$m^2 \cdot s^{-1}$
\emptyset	Fator proporcional dependente da tensão superficial	
ω	Profundidade da constrição	mm

Índices Sobrescritos

o	Condições padrão
$*$	Em solução saturada
g	Expoente de crescimento
i	Índice de potência
j	Índice de potência

n Índice de potência

Índices Subscritos

cris Cristalização

f Final

i Espécie

i Inicial

l Lisozima

NaCl Cloreto de sódio

s Em solução saturada

Lista de Siglas

CEB Centro de Engenharia Biológica

CSP Constrições suaves de parede

LEPABE Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente, Biotecnologia e Energia

RFO Reator de fluxo oscilatório

RFO-CSP Reator de fluxo oscilatório com constrições suaves de parede

rpm Rotações por minuto

UV-VIS Ultravioleta-Visível

Lista de Figuras

Figura 2-1. Diagrama de fases para a cristalização de proteínas (Chayen, 2005)	6
Figura 2-2. Classificação da nucleação (Rodrigues, 2016)	7
Figura 2-3. Etapas prováveis de nucleação de proteínas (McPherson & Kuznetsov, 2014).	8
Figura 2-4. Variação da energia livre de Gibbs na formação de cristais em solução (Lee & Kim, 2003) ..	9
Figura 2-5. Esquema representativo da teoria clássica da nucleação e da teoria da nucleação em duas etapas: a) Solução sobressaturada; b) aglomerado ordenado de moléculas de soluto; c) aglomerado de moléculas de soluto; d) núcleos cristalinos ordenados; e) cristal (Erdemir et al., 2009)	10
Figura 2-6. Sequência de passos no crescimento de cristais em solução (Hernandes, 1988).....	12
Figura 3-1. Esquema representativo de um cristalizador do tipo tanque agitado (Kwon et al., 2015) ..	15
Figura 3-2. Mecanismo de mistura no RFO (Reis, 2006)	17
Figura 3-3. Representação esquemática do RFO-CPS (WO 2015/056156 A1, 2015)	18
Figura 4-1. Instalação experimental para o tanque agitado	21
Figura 4-2. Instalação experimental para os ensaios realizados no RFO-CSP. A- motor linear; B-RFO-CSP; C- bomba de infusão; D- entrada para o reator; E - saída do reator.....	21
Figura 4-3. Esquema do RFO-CSP. A - Geometria utilizada nos ensaios (Almeida, 2017)	22
Figura 5-1. Variação da concentração de lisozima a pH 4,7 e a 20 °C a diferentes concentrações de NaCl, em %(p/v), ao longo de 26 dias	23
Figura 5-2. Perfil de concentração da lisozima para a concentração inicial de 25 g·L ⁻¹ e para as velocidades de agitação de 100, 200 e 300 rpm.	25
Figura 5-3. Perfis de concentração da lisozima para a concentração inicial de lisozima de 50 g·L ⁻¹ e para as velocidades de agitação de 100, 200 e 300 rpm.....	26
Figura 5-4. Pontos em que as amostras foram retiradas durante a cristalização de lisozima para a concentração inicial de 25 g·L ⁻¹ e velocidades de agitação de 100, 200 e 300 rpm.	27
Figura 5-5. Imagens dos cristais de lisozima obtidos na cristalização da lisozima para a concentração inicial de 25 g·L ⁻¹ e velocidade de agitação de 100 rpm.....	28
Figura 5-6. Imagens dos cristais de lisozima obtidos na cristalização da lisozima para a concentração inicial de 25 g·L ⁻¹ e velocidade de agitação de 200 rpm.....	29
Figura 5-7. Imagens dos cristais de lisozima obtidos na cristalização da lisozima para a concentração de 25 g·L ⁻¹ e velocidade de 300 rpm.	30
Figura 5-8 Pontos em que as amostras foram retiradas durante a cristalização de lisozima para a concentração inicial de 50 g·L ⁻¹ e velocidades de agitação de 100, 200 e 300 rpm.	32

Figura 5-9. Imagens dos cristais de lisozima obtidos na cristalização da lisozima para a concentração inicial de $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e velocidade de agitação de 100 rpm.....	33
Figura 5-10. Imagens dos cristais de lisozima obtidos na cristalização da lisozima para a concentração inicial de $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e velocidade de agitação de 200 rpm.....	34
Figura 5-11. Imagens dos cristais de lisozima obtidos na cristalização da lisozima para a concentração inicial de $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e velocidade de agitação de 300 rpm.....	35
Figura 5-12. Observação na lupa da amostra final no RFP-CSP: A) $x_0 = 1,0 \text{ mm}$; B) $x_0 = 2,0 \text{ mm}$	38
Figura 5-13. Mistura no meso-reator: A- para $x_0 = 1,0 \text{ mm}$; B- para $x_0 = 2,0 \text{ mm}$	39
Figura B-1. Perfil de concentração para todos os ensaios realizados a 100 rpm e para uma concentração inicial de lisozima de $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$	50
Figura B-2. Perfil de concentração para todos os ensaios realizados a 200 rpm e para uma concentração de lisozima inicial de $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$	50
Figura B-3. Perfil de concentração para todos os ensaios realizados a 300 rpm e para uma concentração de lisozima inicial de $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$	51
Figura B-4. Perfil de concentração para todos os ensaios realizados a 100 rpm e para uma concentração de lisozima inicial de $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$	51
Figura B-5. Perfil de concentração para todos os ensaios realizados a 200 rpm e para uma concentração de lisozima inicial de $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$	52
Figura B-6. Perfil de concentração para todos os ensaios realizados a 300 rpm e para uma concentração de lisozima inicial de $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$	52
Figura C-1. Imagens referentes à velocidade de 100 rpm para diferentes tempos	53
Figura C-2. Imagens referentes à velocidade de 200 rpm para diferentes tempos.	54
Figura C-3. Imagens referentes à velocidade de 300 rpm para diferentes tempos	55
Figura C-4. Imagens referentes à velocidade de 100 rpm para diferentes tempos	56
Figura C-5. Imagens referentes à velocidade de 200 rpm para diferentes tempos	57
Figura C-6. Imagens referentes à velocidade de 300 rpm para diferentes tempos	58
Figura D-1. Onda sinusoidal para $f = 5 \text{ Hz}$ e $x_0 = 1,0 \text{ mm}$	59
Figura D-2. Onda sinusoidal para $f = 5 \text{ Hz}$ e $x_0 = 2,0 \text{ mm}$	59
Figura F-1. Imagem do reator para $f = 5 \text{ Hz}$ e $x_0 = 1,0 \text{ mm}$	61
Figura F-2. Imagem do reator para $f = 5 \text{ Hz}$ e $x_0 = 1,0 \text{ mm}$	62
Figura F-3. Imagem do reator para $f = 5 \text{ Hz}$ e $x_0 = 2,0 \text{ mm}$	62
Figura F-4. Imagem do reator para $f = 5 \text{ Hz}$ e $x_0 = 2,0 \text{ mm}$	63

Lista de Tabelas

Tabela 4-1. Dimensões da secção A do RFO-CSP apresentada na Figura 4-3 (Almeida, 2017)	22
Tabela 5-1: Comparação entre os valores medidos, os valores determinados pela equação (5.1) e os valores da literatura (Forsythe et al., 1999) para a solubilidade da lisozima a diferentes concentrações de NaCl, a $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e pH 4.7.....	24
Tabela 5-2. Evolução do tamanho típico dos cristais de lisozima ao longo do processo de cristalização para uma concentração de lisozima inicial de $25\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e a diferentes velocidades de agitação. As letras designam diferentes pontos, identificados nos perfis de concentração, que correspondem a diferentes tempos.....	31
Tabela 5-3. Evolução do tamanho típico dos cristais de lisozima ao longo do processo de cristalização para uma concentração de lisozima inicial de $50\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e a diferentes velocidades de agitação. As letras designam diferentes pontos, identificados nos perfis de concentração, que correspondem a diferentes tempos.....	36
Tabela 5-4. Rendimento para as diferentes concentrações iniciais de lisozima e diferentes velocidades de agitação	37
Tabela 5-5. Tamanho típico dos cristais obtidos no RFO-CSP	39
Tabela 5-6. Resultados do RFO-CSP, para $f = 5\text{ Hz}$, $x_0 = 1\text{ mm}$ e $x_0 = 2\text{ mm}$	40
Tabela 5-7. Rendimento no Tanque Agitado e no RFO-CSP para a concentração inicial de lisozima de $50\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, para os primeiros 203 minutos.	41
Tabela A-1. Solubilidade da lisozima a pH 4,6 nas concentrações de NaCl de 2,3,4,5 e 7 % (Forsythe et al., 1999).....	49
Tabela A-2. Solubilidade da lisozima a pH 4,8 nas concentrações de NaCl de 2,3,4,5 e 7 % (Forsythe et al., 1999).....	49
Tabela A-3. Solubilidade da lisozima a pH 4,7 e a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ nas concentrações de NaCl de 0,1, 2,3,4,5,6 e 7 % (Forsythe et al., 1999).	49
Tabela E-1. Concentração final obtida para os diferentes ensaios no RFO-CSP e o respetivo rendimento	60
Tabela G-1. Rendimentos do Tanque Agitado para a concentração inicial de $50\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, nos primeiros 203 minutos	65

1 Introdução

1.1 Enquadramento e Apresentação do Projeto

A cristalização consiste na conversão de uma ou mais substâncias no estado gasoso, líquido ou sólido amorfo para o estado cristalino (Mersmann, 2001). É uma das mais antigas técnicas de separação conhecidas e tem sido amplamente utilizada em vários processos químicos (Erdemir et.al, 2009; Nagy & Braatz, 2012). É frequentemente utilizada como etapa final ou intermediária de purificação, uma vez que permite obter elevados graus de pureza (Nagy & Aamir, 2012; Saikumar et al., 1998). Na indústria farmacêutica mais de 90 % dos princípios ativos são produzidos na forma cristalina (Saleemi, 2011).

No que diz respeito à cristalização de proteínas, é utilizada, sobretudo, para a determinação da estrutura tridimensional de proteínas por cristalografia de raios-X (Giegé, 2013). As proteínas desempenham um papel fundamental no organismo, sendo responsáveis pela sua estrutura e funcionamento (Berg et al., 2002; Garrett & Grisham, 2010). Como a sua função está ligada à sua estrutura, o conhecimento detalhado desta estrutura é crucial para a compreensão dos mecanismos biológicos e o desenvolvimento de fármacos (McPherson & Gavira, 2014). No entanto, a cristalização de proteínas também se apresenta como uma técnica de purificação de proteínas altamente seletiva e rentável, quando comparado com os métodos de cromatografia atualmente empregues. O processo a jusante pode contribuir até 80% dos custos totais de produção. Neste contexto, a cristalização não desnatura a proteína, proporciona algum efeito de estabilização e permite a obtenção de um elevado grau de pureza numa só etapa (Lee & Kim, 2003). Apesar destas vantagens, a cristalização de proteínas como etapa de purificação tem sido pouco implementada na indústria, sendo a insulina (Eli Lilly) uma das poucas proteínas cristalizadas comercialmente (Saikumar et al., 1998).

Embora os requisitos sobre os cristais e o processo sejam bastante diferentes para os dois propósitos, o passo inicial consiste no estabelecimento das condições de cristalização da proteína em estudo (Etzel, 2007; Lee & Kim, 2003; Schmidt et al., 2005). Enquanto para a determinação da estrutura tridimensional são requeridos cristais de elevada qualidade, i.e., com boas propriedades de difração, o rendimento e o grau de pureza devem ser elevados para a cristalização de proteínas como meio de purificação. Na cristalografia de raios-X, os cristais são tipicamente obtidos por processos de crescimento lento em condições quiescentes, embora para fins de purificação é esperado um tempo de cristalização curto e é necessário um mínimo de agitação para assegurar um meio de cristalização uniforme e evitar assim gradientes de concentração. No entanto, a cristalização de proteínas é um processo complexo e multiparamétrico, envolvendo a otimização de diversas variáveis (temperatura, pH e

concentrações de proteína e agente precipitante...). Para além disso, a nossa compreensão do mecanismo de cristalização de proteínas ainda é insuficiente, sendo a determinação das condições de cristalização amplamente baseada em abordagens de tentativa e erro.

Para superar algumas das lacunas observadas em cristalizadores comuns, a Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, em colaboração com a Universidade do Minho, desenvolveu um novo tipo de reator, designado por reator de fluxo oscilatório com constrições suaves de parede, RFO-CSP (WO 2015/056156 A1, 2015; WO 2017/175207 A1). O dispositivo é operado sob mistura de fluxo oscilatório e já demonstrou melhorias significativas em diversos processos de cristalização (Castro et al., 2016, 2018).

Neste trabalho comparou-se o desempenho de um tanque agitado e de um RFO-CSP na cristalização de uma proteína modelo, a lisozima. A lisozima é uma das proteínas modelo mais populares, uma vez que cristaliza facilmente e dado o elevado conhecimento sobre o seu comportamento em solução e suas cinéticas de nucleação e crescimento, permitindo assim uma abordagem mais sistemática na otimização das suas condições de cristalização.

Neste estudo foi avaliada a influência da intensidade de mistura assim como da concentração inicial de lisozima em termos de morfologia e tamanho dos cristais finais (avaliados por microscopia ótica) e rendimento (através da concentração de lisozima medida por espectrofotometria), com o objetivo de produzir cristais de tamanho e morfologia controlados com um elevado rendimento.

1.2 Organização da Tese

A presente dissertação está dividida em 6 capítulos, nos quais são abordados os seguintes temas:

Capítulo 1 - **Introdução** - é feito um enquadramento do tema, apresentada a organização da dissertação e a apresentada a definição dos objetivos do trabalho.

Capítulo 2 - **Fundamentos da cristalização de proteínas** - aqui são abordados os conceitos teóricos da cristalização de proteínas.

Capítulo 3 - **Design do processo** - são abordados os parâmetros relevantes na implementação de um processo de cristalização de proteínas para fins de purificação.

Capítulo 4 - **Materiais e métodos** - são descritos os materiais utilizados, assim como as instalações experimentais utilizadas ao longo do trabalho.

Capítulo 5 - **Resultados e Discussão** - este capítulo é subdividido entre o tanque agitado e o RFO-CSP. Em cada subcapítulo são apresentados os resultados obtidos para cada um dos reatores e a discussão dos mesmos.

Capítulo 6 - **Conclusões** - são apresentadas as principais conclusões de todo o trabalho desenvolvido.

Capítulo 7 - **Avaliação do trabalho realizado** - neste último capítulo são apresentados os objetivos que realmente foram realizados, propostas de trabalhos futuros e a apreciação do trabalho desenvolvido.

2 Fundamentos da cristalização de proteínas

A cristalização de proteínas ocorre em duas etapas, a nucleação e o crescimento (Chayen, 2005). Contudo Lee e Kim (2003), Durbin e Feher (1996), entre outros enunciam uma outra etapa, denominada por cessação do crescimento. Esta pode ocorrer por diferentes motivos, desde a diminuição da concentração do soluto na fase líquida, tensão na rede cristalina e ao envenenamento da superfície (Lee & Kim, 2003). Porém para que a nucleação aconteça é necessário assegurar condições termodinâmicas favoráveis, ou seja, que levem as moléculas a aproximarem-se e agruparem-se (Rodrigues, 2016). Além disso, a cristalização de proteínas envolve a otimização de múltiplas variáveis, tais como o tipo e concentração de agente precipitante, pH, temperatura (Rodrigues, 2016; Stevens, 2000). A utilização de diagramas de fase é vantajosa, quando conhecido, permitindo uma abordagem mais racional no estabelecimento das condições ótimas de cristalização.

2.1 Termodinâmica da cristalização das proteínas

2.1.1 Pureza da proteína

As proteínas são extraídas de uma mistura biológica complexa, como tal, o grau de purificação desempenha um papel importante na cristalização (Ducruix & Giegé, 1999). Quando os cristais são obtidos a partir de misturas, são, normalmente, pequenos, mal moldados e apresentam má qualidade de difração (Ducruix & Giegé, 1999). A baixa pureza é a causa mais comum para uma cristalização malsucedida.

2.1.2 Solubilidade e sobressaturação

Para que a cristalização ocorra é necessário que haja sobressaturação, ou seja, a concentração de soluto em solução tem de estar acima da sua solubilidade. Entende-se por solubilidade a concentração de proteína numa solução saturada que está em equilíbrio com uma fase sólida, cristalina ou amorfa, e que depende de um conjunto de parâmetros, tais como, o pH, natureza e quantidade de impurezas, força iónica, temperatura e solventes (Kramer et.al, 2012).

A sobressaturação é expressa pela diferença entre os potenciais químicos numa solução sobressaturada, μ , e numa solução saturada, μ_s , (Mersmann, 2001).

$$\mu - \mu_s = RT \ln \frac{a}{a_s} \quad (2.1)$$

Onde R é a constante dos gases, T a temperatura, a e a_s são as atividades na solução sobressaturada e na solução saturada, respetivamente. O potencial químico na solução saturada e na solução sobressaturada são dados pelas equações (2.2) e (2.3), respetivamente.

$$\mu = \mu_i^0 + RT \ln a \quad (2.2)$$

$$\mu_s = \mu_i^0 + RT \ln a_s \quad (2.3)$$

Onde μ_i^0 é o potencial químico padrão da espécie i .

A razão das atividades, na equação (2.4) podem ser relacionadas com a concentração:

$$\frac{a}{a_s} = \frac{a}{a^*} = \frac{\gamma C}{\gamma^* C^*} \quad (2.4)$$

Sendo γ e C o coeficiente de atividade e concentração da proteína em solução, respetivamente. O asterisco refere-se aos termos em equilíbrio. Normalmente, considera-se a razão dos coeficientes de atividade na solução sobressaturada e saturada igual a 1. Assim, a sobressaturação é dada por:

$$S = \frac{C}{C^*} \quad (2.5)$$

2.1.3 Variáveis que afetam a solubilidade das proteínas

Existem múltiplas variáveis que afetam a solubilidade de uma proteína em solução, tais como o tipo de concentração do agente precipitante, a temperatura e o pH.

Os agentes precipitantes influenciam as propriedades do solvente na solução e são divididos em três grupos principais: sais, polímeros e solventes orgânicos (Lee & Kim, 2003; McPherson & Gavira, 2014). Os sais são os agentes precipitantes mais comuns e eficazes na cristalização de proteínas. Estes competem com as proteínas pelas moléculas de água (McPherson & Gavira, 2014). A baixas concentrações de iões, a solubilidade de proteína irá aumentar com a adição de iões - fenómeno *salting-in* (McPherson & Gavira, 2014). Os iões adicionados à solução vão proteger as várias cargas iónicas da proteína, enfraquecendo as forças de atração entre as moléculas de proteína, ou seja, as forças promotoras da agregação e de cristalização (Rodrigues, 2016). Com o aumento da concentração de espécies iónicas ocorre a diminuição da solubilidade da proteína uma vez que os iões vão competir com as moléculas de proteínas pelas moléculas de água - fenómeno *salting-out* (Rodrigues, 2016).

A temperatura também influencia a solubilidade, isto porque, existe variação da constante de reação ácido/base das cadeias laterais da proteína com a temperatura (Krauss et al., 2013). O efeito da temperatura é maior quando a força iónica da solução é baixa (Rodrigues, 2016; Wiencek, 2002). As proteínas devem ser manuseadas numa gama de temperatura entre 0

e 40 °C, de forma a que não desnaturem. Normalmente, são cristalizadas a 4 °C ou a temperatura ambiente (Lee & Kim, 2003).

O pH altera a força de atração iónica entre os aminoácidos, influenciando a cristalização, que ocorre, frequentemente, numa gama estreita de pH, ou seja, a valores de pH que mantêm a estrutura da proteína enrolada (Lee & Kim, 2003; Krauss et al., 2013). A solubilidade da proteína é mínima no ponto isoelétrico, onde a carga é nula (Wienczek, 2002).

2.1.4 Diagrama de fases

O diagrama de fases relaciona o estado do material (líquido, cristalino ou sólido amorfo) em função de variáveis relevantes, como a concentração de proteína, temperatura, pH, força iónica, concentração de agente precipitante e aditivos (Asherie, 2004; Chayen, 2005). Geralmente, o diagrama de fase é bidimensional, em que a concentração da proteína em estudo é representada em função de um determinado parâmetro (pH, temperatura...), sendo os outros parâmetros constantes (Asherie, 2004) .

Um diagrama de fases é constituído por quatro zonas, representadas na Figura 2-1.

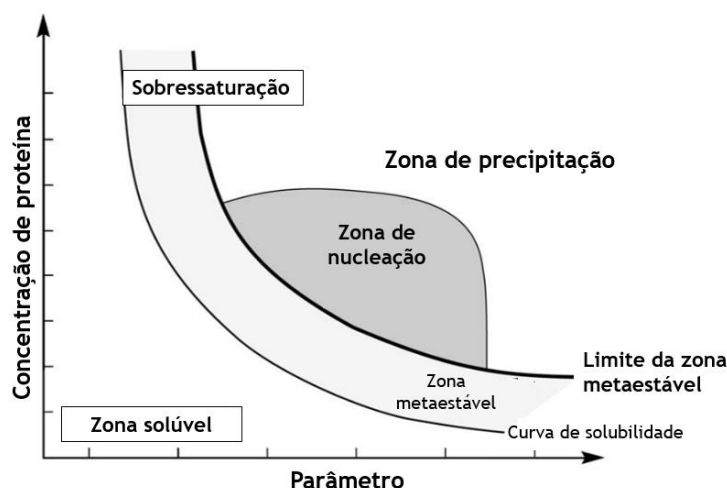


Figura 2-1. Diagrama de fases para a cristalização de proteínas (Chayen, 2005)

A zona solúvel é a zona abaixo da curva de solubilidade, ou seja, a proteína é solúvel e não irá cristalizar (Chayen, 2005; Etzel, 2007). Na zona metaestável, os cristais são estáveis e podem crescer, não irá ocorrer a formação de novos núcleos (Chayen, 2005). De seguida é a zona de nucleação, onde a sobressaturação é moderada e é caracterizada pela ocorrência de nucleação espontânea (Chayen, 2005). Por último, na zona de precipitação a sobressaturação é muito elevada e a proteína irá precipitar, formam-se agregados amorfos (Chayen, 2005; Etzel, 2007).

2.2 Cinética da cristalização de proteínas

2.2.1 Nucleação

A nucleação é a primeira etapa da cristalização e determina muitas das propriedades do cristal em formação. O fenómeno de nucleação é de natureza estocástica e é o passo mais difícil de abordar teoricamente e experimentalmente (McPherson, 2004).

A nucleação divide-se em primária e secundária (Figura 2-2). Na primária, a nucleação ocorre na ausência de qualquer matéria cristalina, enquanto na secundária a nucleação ocorre na vizinhança de cristais presentes no sistema sobressaturado (Mullin, 2001). A nucleação primária pode seguir por diferentes mecanismos, homogéneo ou heterogéneo. No caso da homogénea, há um movimento aleatório das moléculas que resulta no ordenamento das mesmas, geralmente acontece com materiais de elevada pureza e a sobressaturações muito elevadas. Quanto à nucleação heterogénea, esta é promovido pela presença de agentes externos (parede do cristalizador, superfície do agitador...) (Mullin, 2001; Rodrigues, 2016).

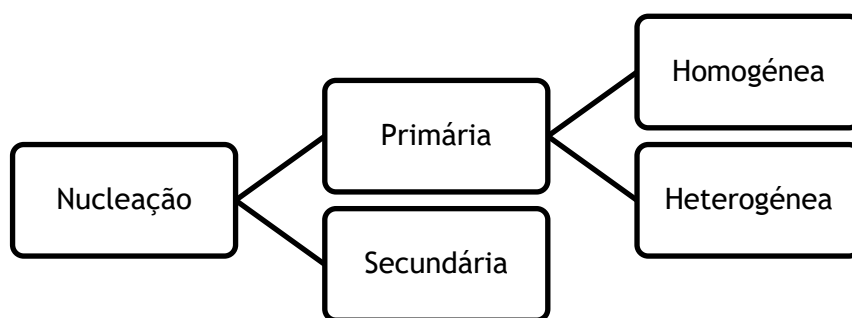


Figura 2-2. Classificação da nucleação (Rodrigues, 2016)

Nucleação primária homogénea

Na Figura 2-3, estão representadas as etapas prováveis da nucleação de proteínas. Segundo a teoria clássica de nucleação, as moléculas começam a associar-se, formando agregados (I) que evoluem para embriões (II). Posteriormente, os agregados reorganizam-se e aumentam de tamanho, evoluindo para um núcleo crítico (III) (McPherson & Kuznetsov, 2014). Por fim (IV), as moléculas livres em solução são absorvidas na superfície do cristal e vão aumentar o seu tamanho por incorporação na rede cristalina para produzir o cristal (McPherson & Gavira, 2014; McPherson & Kuznetsov, 2014; Wiencek, 2002). Para que a nucleação ocorra é necessário níveis de sobressaturação muito elevados de forma a ultrapassar a barreira energética de ativação (García-Ruiz, 2003; McPherson & Kuznetsov, 2014).

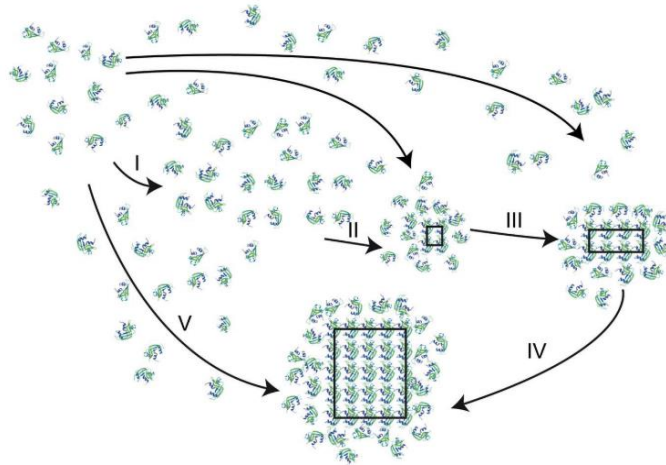


Figura 2-3. Etapas prováveis de nucleação de proteínas (McPherson & Kuznetsov, 2014).

Do ponto de vista termodinâmico, a variação de energia livre de Gibbs é expressa pela equação (2.6), sendo a temperatura e a pressão constantes (Lee & Kim, 2003).

$$\Delta G = V \times \Delta G_V + A \times \Delta G_A \quad (2.6)$$

Onde V é o volume e A é a área superficial do núcleo. ΔG_V e ΔG_A são a variação de energia livre de Gibbs devido a variações do volume e na área de superfície, respetivamente (Lee & Kim, 2003). ΔG_A é dada pela tensão superficial, σ , presente entre a superfície cristalina que está a desenvolver-se e a solução sobressaturada do meio (Lee & Kim, 2003):

$$\Delta G_A = \sigma \quad (2.7)$$

ΔG_V está relacionado com a afinidade molecular dos solutos, dependendo da concentração do soluto na solução, equação (2.8):

$$\Delta G_V = -\left(\frac{kT}{V_M}\right) \ln\left(\frac{a}{a^*}\right) \quad (2.8)$$

sendo k a constante de Boltzmann, T a temperatura, V_M é o volume de uma molécula de soluto, a e a^* são as atividades do soluto em solução e no equilíbrio, respetivamente (Lee & Kim, 2003).

A equação (2.8), pode ser reescrita, assumindo que o coeficiente de atividade de um soluto é igual a 1 e que o embrião é esférico, a variação de energia livre de Gibbs é dada pela seguinte equação (Lee & Kim, 2003):

$$\Delta G = -4/3\pi r^3 \left(\frac{kT}{V_M}\right) \ln\left(\frac{C}{C_s}\right) + 4\pi r^2 \sigma \quad (2.9)$$

Onde C e C_s são as concentrações de soluto em solução e no equilíbrio, respetivamente, e r é o raio do embrião.

Como a tensão superficial, o raio do embrião, o volume molecular do soluto, a temperatura e a constante de Boltzmann assumem valores positivos fisicamente, a equação

(2.9), sugere que a energia livre de Gibbs está sempre a aumentar em relação ao raio do embrião (Lee & Kim, 2003).

Na Figura 2-4 observa-se a variação da energia livre de Gibbs em função do raio do embrião, e dependendo da razão entre a concentração do soluto em solução e no equilíbrio, ou seja, da sobressaturação.

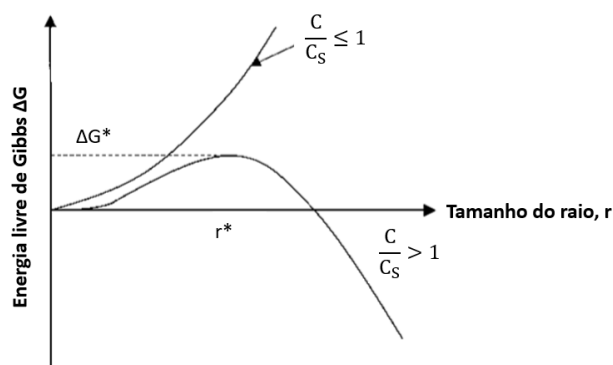


Figura 2-4. Variação da energia livre de Gibbs na formação de cristais em solução (Lee & Kim, 2003)

Pela Figura 2-4, se a concentração de soluto for inferior a concentração de equilíbrio, ou seja, $\frac{C}{C_s} \leq 1$, significa que a cristalização não ocorre espontaneamente, e deve ser fornecido trabalho externo para o embrião crescer (Lee & Kim, 2003). No entanto, quando a concentração do soluto é maior que a concentração de equilíbrio, ou seja, $\frac{C}{C_s} > 1$, a variação de volume do embrião causa a redução da energia livre, o que pode resultar na maximização da variação de energia livre de Gibbs relativamente ao tamanho do embrião (Lee & Kim, 2003).

A variação máxima de energia livre de Gibbs, ΔG^* , em relação ao raio do embrião é obtida pela derivada da Equação (2.9):

$$\Delta G = 16\pi\sigma^3/3\left[\left(\frac{kT}{V_M}\right)\ln\left(\frac{C}{C_s}\right)\right]^2 \quad (2.10)$$

Sendo que:

$$r^* = 2\sigma/\left(\frac{kT}{V_M}\right)\ln\left(\frac{C}{C_s}\right) \quad (2.11)$$

Onde r^* é o raio crítico, corresponde ao raio do embrião quando a energia livre de Gibbs é máxima, esta energia máxima é também denominada de “energia de ativação crítica”.

Ainda na Figura 2-4, observa-se que abaixo do raio crítico a energia livre de Gibbs aumenta com o aumento no raio do embrião, indicando que a dissolução do embrião é reversível (Lee & Kim, 2003). Acima do raio crítico, o crescimento do embrião é irreversível, a energia livre de Gibbs diminui em relação ao tamanho do embrião (Lee & Kim, 2003).

A velocidade de nucleação, J , número de núcleos formados por unidade de tempo por unidade de volume, pode ser expressa por uma equação de Arrhenius (Lee & Kim, 2003):

$$J = A \exp\left(-\frac{\Delta G^*}{kT}\right) \quad (2.12)$$

Onde A é um fator pré-exponencial, que toma o valor de $\frac{2D}{d^5}$, sendo D o coeficiente de difusão e d o diâmetro da molécula de soluto.

Assumindo que o núcleo é uma esfera, a velocidade de nucleação é dada por:

$$J = A \exp\left(-\frac{16\pi\sigma^3}{3\left\{\left[\left(\frac{kT}{V_M}\right)\ln\left(\frac{C}{C_S}\right)\right]^2 kT\right\}}\right) \quad (2.13)$$

Os parâmetros coeficiente de difusão, tamanho da molécula de soluto, volume, temperatura, entre outros presentes na equação (2.12), encontram-se na literatura e/ou são mensuráveis. Contudo, a tensão superficial do núcleo é difícil de medir, uma vez que, o núcleo é muito pequeno, impossibilitando a medição do ângulo de contacto interfacial (Lee & Kim, 2003).

A teoria clássica de nucleação explica o mecanismo de nucleação baseado na flutuação e na origem da barreira de nucleação, contudo, existe alguma controvérsia, uma vez que têm sido verificadas diferenças entre os valores experimentais das velocidades de nucleação e as previsões teóricas (Nanev, 2018). Estas discrepâncias levaram ao aparecimento do mecanismo de nucleação em duas etapas (Figura 2-5). Este mecanismo sugere que o soluto na solução sobressaturada forma, primeiramente, pequenos aglomerados ou uma fase líquida densa (c), e posteriormente, há uma reorganização numa estrutura ordenada (d) (Sauter et al., 2015). Na Figura 2-5 é apresentado um esquema representando a teoria clássica da nucleação e a teoria da nucleação em duas etapas.

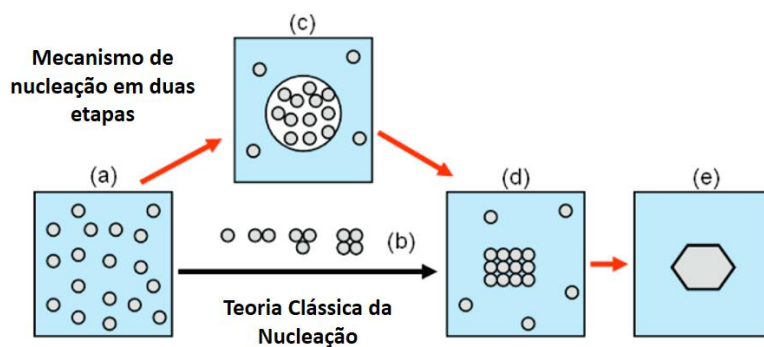


Figura 2-5. Esquema representativo da teoria clássica da nucleação e da teoria da nucleação em duas etapas: a) Solução sobressaturada; b) aglomerado ordenado de moléculas de soluto; c) aglomerado de moléculas de soluto; d) núcleos cristalinos ordenados; e) cristal (Erdemir et al., 2009)

Nucleação primária heterogénea

O grau de sobressaturação necessário e a energia de ativação crítica são geralmente menores na nucleação heterogénea quando comparado com a nucleação homogénea (Lee & Kim, 2003):

$$\Delta G^{*'} = \emptyset \Delta G^* \quad (2.14)$$

Sendo \emptyset o fator proporcional que depende da tensão interfacial e cujo valor é geralmente inferior a 1. A tensão interfacial entre uma superfície externa e a solução é determinada pelo ângulo de contato, e pode ser derivada como (Lee & Kim, 2003):

$$\emptyset = (2 + \cos\theta)(1 - \cos\theta)^2/4 \quad (2.15)$$

Onde θ é o ângulo de contato entre o sólido e o líquido. Quando θ é 180° , $\Delta G^{*'}$ é igual a ΔG^* , o que significa que a energia de ativação crítica não é reduzida pela superfície externa. Quando é menor que 180° , a superfície externa tem um papel na redução da energia de ativação crítica e no início da nucleação (Lee & Kim, 2003).

Nucleação secundária

A nucleação secundária é o mecanismo de nucleação dominante em cristalizadores industriais. Ocorre geralmente a uma sobressaturação muito mais baixa do que a nucleação primária quando os cristais em estudo já estão presentes ou são deliberadamente adicionados (sementeira) ao meio de cristalização. A nucleação secundária pode ser impulsionada por muitos mecanismos diferentes, como contato, cisalhamento, atrito, fratura e assim por diante (Lee & Kim, 2003). A equação (2.16) permite estimar a velocidade de nucleação secundária envolvendo alguns fatores que influenciam este tipo de nucleação (Lee & Kim, 2003):

$$J = k_n' (C - C_s)^i (MF)^j \quad (2.16)$$

Onde k_n' é a constante de velocidade de nucleação secundária, MF é o fator de maior influência na nucleação secundária, excluindo a sobressaturação, e i e j são os índices de potência. Quando a nucleação secundária é controlada pela velocidade de agitação, por exemplo, o parâmetro MF da equação (2.16) poderá ser a velocidade de agitação (Lee & Kim, 2003). Se os mecanismos dominantes forem o atrito e a fratura, a densidade da fase sólida da suspensão poderá ser o fator de maior influência (Lee & Kim, 2003).

2.2.2 Crescimento

O crescimento cristalino é a etapa que está melhor caracterizada. Este envolve diferentes etapas (Figura 2-6). A molécula de soluto na solução sobressaturada é transportada para a superfície do cristal (i), devido ao gradiente de concentração, e vai ser adsorvida (ii para iii) (Lee & Kim, 2003). Aqui, o soluto, liberta moléculas de água que lhe estavam associadas, e

difunde-se na superfície (iv) a fim de encontrar o local de menor energia, “local de crescimento” (v e vii) (Cruz, 2015; Lee & Kim, 2003). A última etapa é a incorporação na unidade de crescimento da rede cristalina (Lee & Kim, 2003). O ponto iv*, na Figura 2-6, corresponde à dessorção.

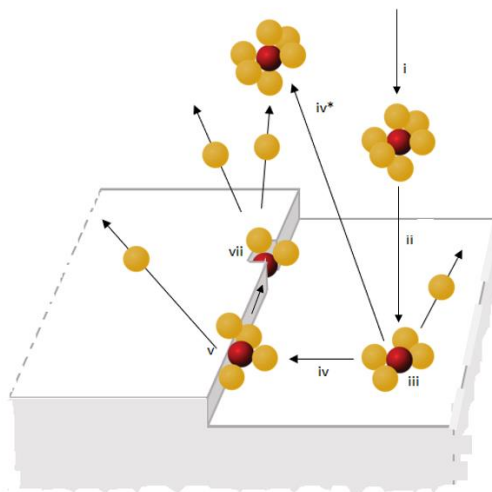


Figura 2-6. Sequência de passos no crescimento de cristais em solução (Hernandes, 1988)

Vários mecanismos de crescimento têm sido explorados, existindo várias teorias, tendo como base a teoria de adsorção em camada. Segundo esta teoria, quando uma molécula de soluto de uma solução sobressaturada atinge a interface cristal/solução, a molécula pode ser incorporada na superfície do cristal de três formas: a molécula de soluto liga-se ao cristal apenas na superfície de uma camada de crescimento (iii); a molécula liga-se à superfície e a um degrau (v); a molécula liga-se a três superfícies num local designado por “kink” (vii) (Lee & Kim, 2003).

Cinética de crescimento

Na cristalização industrial, o crescimento de cristais é frequentemente descrito como um mecanismo simples controlado por difusão e integração à superfície (Lee & Kim, 2003). Karpinski (1985) desenvolveu um modelo de crescimento tendo em conta essas duas etapas. Neste modelo, o soluto é transportado da solução para a interface do cristal, isto pelo processo de transferência de massa (passo de difusão) e, posteriormente, o soluto é disposto no local de crescimento do cristal pelo processo de integração molecular (etapa de integração à superfície) (Lee & Kim, 2003). Cada passo pode ser expresso como:

$$\frac{dm}{dt} = Ak_m(C - C_i) \quad (2.17)$$

$$\frac{dm}{dt} = Ak_r(C_i - C^*) \quad (2.18)$$

Sendo C_i a concentração de proteína na solução na interface entre o cristal e a solução. Como as concentrações interfaciais são difíceis de medir, considera-se a diferença de concentrações, $C - C^*$, como força motriz. Assim, a equação geral baseada nessa força motriz é escrita como:

$$\frac{dm}{dt} = K_G A (C - C^*)^g \quad (2.19)$$

K_G é o coeficiente global de crescimento de cristal e g é a ordem do processo de crescimento global.

3 *Design* do processo

3.1 Métodos de gerar sobressaturação

No caso da cristalização à escala industrial, os métodos mais usados para gerar sobressaturação são a evaporação, arrefecimento e adição de solventes, precipitantes ou outros produtos químicos (Nagy & Braatz, 2012). A estabilidade térmica limitada das proteínas restringe a gama de condições operacionais e a escolha da metodologia. O uso da evaporação é impedido e o intervalo de temperatura que pode ser usado durante a cristalização por arrefecimento é limitado. No entanto, o arrefecimento tem a vantagem de não ser necessário o uso de um composto adicional. Relativamente ao método da adição de solvente ou precipitantes, é geralmente operado a baixas temperaturas e tem uma influência mais significativa na morfologia ou nas formas polimórficas do cristal que no caso da cristalização por arrefecimento. As desvantagens dessa metodologia incluem gradientes de sobressaturação elevados e custos adicionais associados à remoção do solvente (Wagner, 2009). Outras formas de gerar sobressaturação foram relatadas na literatura, nomeadamente por *Solvent-freeze-out* e evaporação a baixas pressões. O primeiro método combina a cristalização em solução com a cristalização *solid-layer melt* num único processo (Borbón, 2013). Quanto ao segundo método, apresenta a vantagem de não ser necessário a adição de um agente precipitante e de operar a temperaturas moderadas (Groß & Kind, 2016).

Idealmente a cristalização de proteínas deveria para fins de purificação começar diretamente a partir do caldo de fermentação não tratado. No entanto, a maioria dos estudos existentes na literatura partem de soluções puras e de proteínas modelo, aumentando assim as hipóteses de cristalização.

3.2 *Screening* e otimização das condições de cristalização

Quando se pretende cristalizar uma proteína é necessário analisar um conjunto amplo de condições experimentais, testando diversas variáveis, como o pH, temperatura, tipo e concentração de agente precipitante, concentração de proteína (Jancarik & Kim, 1991). É um processo desafiante, uma vez que pouco se sabe sobre a solubilidade das proteínas, quantidades limitadas de proteína estão disponíveis e a cristalização pode ser lenta (dias, meses). Normalmente, o procedimento de *screening* recorre a um processo iterativo baseado em matrizes bidimensionais, no qual dois fatores são testados. De forma a obter as informações mais úteis a partir do menor número de ensaios, tem-se recorrido a técnicas de automação (robôs) e kits de *screening* de elevado rendimento para facilitar a realização de um grande

número de testes de cristalização. Métodos como fatorial incompleto ou matriz esparsa também foram desenvolvidos (Jancarik & Kim, 1991).

A otimização das condições operacionais com base em critérios como o tamanho e distribuição de tamanho, rendimento e pureza dos cristais é particularmente relevante no que diz respeito aos processos a jusante e à qualidade do produto. A distribuição do tamanho dos cristais afeta as operações a jusante, como filtração e secagem, e ainda, a estabilidade do produto (Braatz, 2002). No caso dos fármacos, um controle insuficiente da distribuição do tamanho dos cristais pode interromper completamente a produção, tendo impacto direto nos pacientes que tiram proveito terapêutico do mesmo (Braatz, 2002). Além da distribuição do tamanho dos cristais, a pureza e a forma do cristal afetam a velocidade de dissolução do produto (Braatz, 2002).

3.3 Cristalizadores e Agitadores

A agitação é um parâmetro muito importante no processo de cristalização, pois, em alguns casos, o crescimento e a morfologias dos cristais em solução são fortemente dependentes da velocidade de agitação (Krauss et al., 2013). Além disso, é necessário que a agitação da solução seja otimizada, de modo a manter os cristais em suspensão e minimizar a sua quebra (Weichsel et al., 2017).

3.3.1 Tanque com e sem agitação

Os tanques são muito utilizados no estudo da cristalização de proteínas, sendo o tanque agitado o cristalizador mais utilizado na indústria (Su et al., 2015). Estes cristalizadores consistem num recipiente que varia em termos de tipo de material, dimensões e tipo de agitador, e pode ser equipado com camisas de arrefecimento/aquecimento, Figura 3-1 (Lee & Kim, 2003).

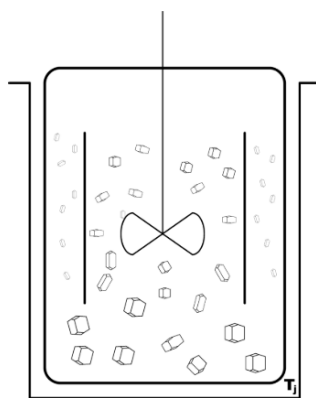


Figura 3-1. Esquema representativo de um cristalizador do tipo tanque agitado (Kwon et al., 2015)

Estudos indicam que é preferível utilizar tanques com agitação, para que a cristalização ocorra mais rápido. Smejkal et al. (2013), estudaram a cristalização do fragmento Fab do

anticorpo terapêutico Canakinumab num tanque agitado e não agitado. Concluíram que com a agitação a cristalização foi quatro vezes mais rápida do que sem agitação. Contudo, vários estudos em diferentes tipos de tanques, agitados ou não agitados e com chicanas ou sem chicanas, mostram resultados variados relativamente à velocidade de crescimento, forma e tamanho médio dos cristais (Neugebauer & Khinast, 2015). Outros tipos de agitação também foram estudados, como agitadores rotativos (Hekmat et al., 2007; Murai et al., 2008), dispositivos com vibrações mecânicas (Lu et al., 2010), dispositivos de fluxo oscilatório (Parambil et al., 2011) ou mistura de fluxo oscilatório (Castro et al., 2016). De uma forma geral os estudos realizados indicam que a mistura pode aumentar ou suprimir a nucleação, dependendo da sua magnitude, sugerindo assim a existência de uma intensidade de mistura ótima.

É de referir ainda que os tanques agitados de grandes dimensões são geralmente caracterizados por uma baixa eficiência de mistura que leva a gradientes de concentração elevados, que por sua vez levam a nucleações espontâneas. Além disso, as tensões de corte exercidas pelos agitadores podem levar à desnaturação das proteínas e à danificação dos cristais (Schmidt et al., 2005).

3.3.2 Cristalizadores tubulares

Os cristalizadores tubulares consistem em tubos que variam em termos de material e dimensões características (diâmetro e comprimento).

Quando comparado com os tanques agitados, estes cristalizadores apresentam vantagens em termos de eficiência de mistura e no scale-up. No entanto, a sua manutenção é geralmente mais complexa e são mais sujeitos a risco de entupimentos (Zhang et al., 2017).

Parambil et al. (2011) estudaram o efeito do fluxo oscilatório na nucleação e crescimento da insulina em capilares de vidro de diâmetro interno de 2,0 mm. Cristais com tamanho inferior a 50 μm com um bom rendimento foram obtidos. Também foi estudada a cristalização da lisozima em modo contínuo num cristalizador tubular de fluxo segmentado com um diâmetro interno de 2 mm e um comprimento total de 13 m (Neugebauer & Khinast, 2015). Ao longo do tubo, a sobressaturação foi controlada, dividindo o cristalizador numa zona de nucleação e de crescimento. Mais recentemente, Yang et al. (2018) estudaram a cristalização da lisozima sob fluxo oscilatório tanto em *batch* como em contínuo num tubo de PVC de 3 mm de diâmetro interno.

3.3.3 Cristalizadores de fluxo oscilatório

O reator de fluxo oscilatório, RFO, consiste numa coluna cilíndrica com constrições colocadas transversalmente ao fluxo e igualmente espaçadas. A mistura num RFO é controlada pela frequência, f , e amplitude, x_0 , de oscilação (Reis, 2006). A direção do fluxo que é

periodicamente invertido, devido a oscilação, interage com as restrições, levando à formação de vórtices (Figura 3-2) (Reis, 2006). A intensidade da mistura pode ser controlada pelos parâmetros geométricos e operacionais do reator.

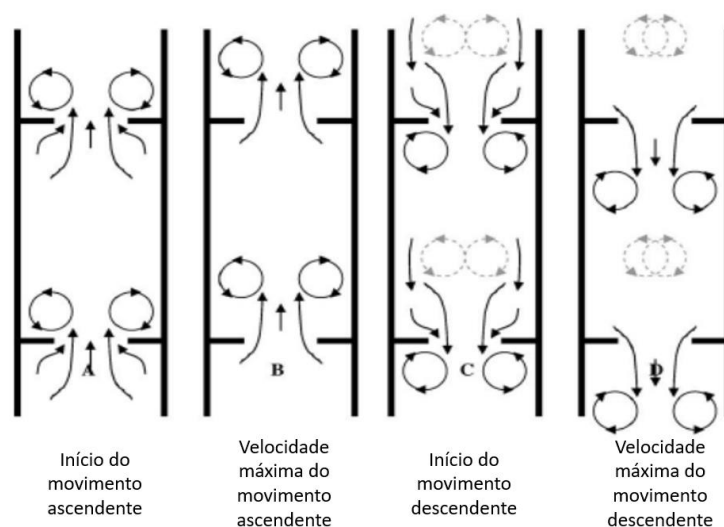


Figura 3-2. Mecanismo de mistura no RFO (Reis, 2006)

O fluxo oscilatório no RFO é caracterizado pelos número de Reynolds, Re_n , Reynolds oscilatório, Re_o e o Strouhal, St (Reis, 2006). O número de Reynolds descreve o tipo de fluxo no tubo sem oscilação, o número de Reynolds oscilatório traduz a intensidade da mistura quando introduzido o movimento oscilatório e o número de Strouhal mede a propagação eficaz dos vórtices. As equações (3.1), (3.2) e (3.3) definem cada um destes números adimensionais (Cruz, 2015; Reis, 2006):

$$Re_n = \frac{u \times d}{\nu} \quad (3.1)$$

$$Re_o = \frac{x_0 \times w \times d}{\nu} \quad (3.2)$$

$$St = \frac{d}{x_0 \times 4\pi} \quad (3.3)$$

Sendo d o diâmetro do tubo, ν a viscosidade cinemática do fluido, u a velocidade média superficial do fluido, x_0 a amplitude da onda sinusoidal e w a frequência de oscilação.

Existem muitas vantagens associadas ao RFO, contudo existem zonas mortas junto às restrições, onde as tensões de corte são intensas devido à rigidez do ângulo que estas fazem com a parede do reator (Cruz, 2015). Para ultrapassar estes problemas foi desenvolvido um meso reator de fluxo oscilatório com restrições periódicas suaves de parede, RFO-CSP (Reis, 2006). Para além da minimização das tensões de corte e dos volumes mortos, o novo reator apresenta-se à escala meso (na ordem dos mililitros), promovendo assim a intensificação da

mistura e reduzindo o consumo de reagentes e a formação de resíduos (Cruz, 2015). Contudo este RFO-CPS apresenta algumas limitações, levando nomeadamente à ocorrência de nucleação secundária, aglomeração e entupimento (Cruz, 2015). Para ultrapassar estes problemas membros do LEPABE em colaboração com o Centro de Engenharia Biológica da Universidade do Minho (CEB) (WO 2015/056156 A1, 2015) otimizaram alguns dos parâmetros geométricos do RFO-CPS. Na Figura 3-3 é apresentado um esquema do RFO-CPS com os parâmetros geométricos que foram otimizados.

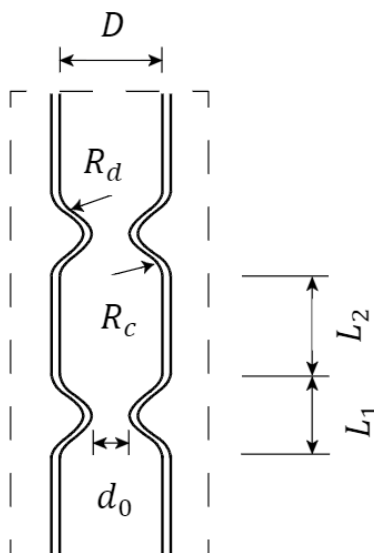


Figura 3-3. Representação esquemática do RFO-CPS (WO 2015/056156 A1, 2015)

Na Figura 3-3, D corresponde ao diâmetro interno do tubo, d_0 é o diâmetro interno do tubo nas constrições, L_1 é o comprimento da constrição, L_2 é o comprimento do tubo sem constrição, $L = L_1 + L_2$ corresponde ao espaço médio entre constrições sucessivas, R_c é o raio de curvatura da parede lateral da subsecção convergente, R_d é o raio de curvatura da parede lateral da subsecção divergente (WO 2015/056156 A1, 2015).

Castro et al. (2016, 2018) já demonstraram a aplicabilidade do RFO-CPS otimizado na cristalização de proteínas. Os autores determinaram primeiramente o diagrama de fases da lisozima no RFO-CPS e verificaram a redução da zona metaestável quando comparado com estudos realizados sem agitação (Castro et al., 2016). Os autores estudaram ainda a influência da intensidade de mistura na cristalização da lisozima, observando a existência de uma intensidade de mistura ótima (Castro et al., 2018).

3.4 Modo de operação

Atualmente, a maioria dos processos de cristalização na indústria ocorre em *batch* (Zhang et al., 2017). Este modo de operação é flexível, permitindo responder a diferentes requisitos e ao mercado, que está em constante mudança (Su et al., 2015). Contudo este modo

de operação tem alguns problemas associados, como os custos de produção e a variabilidade de *batch* para *batch* levando a inconstâncias no produto final (Su et al., 2015; Zhang et al., 2017).

O modo contínuo veio tentar resolver os problemas associados ao modo *batch*. Quando as condições no estado estacionário forem atingidas, todos os cristais são produzidos com o mesmo nível de sobressaturação (Zhang et al., 2017). Assim há maior controlo e reprodutibilidade nas características do produto final (Kwon et al., 2014). Uma das grandes desvantagens deste modo de operação deve-se a escassez de informação para implementação à escala industrial, além de que a aprovação de novas metodologias no processo é estritamente regulada, principalmente no caso da indústria farmacêutica (Su et al., 2015). No caso particular da cristalização de proteínas, a cinética de crescimento é geralmente lenta (Nanev, 2007), levando a tempos de residência elevados, limitando assim a sua implementação em modo contínuo.

3.5 Scale-up

Na literatura não há muitos estudos sobre o *scale-up* dos processos de cristalização de proteínas (Neugebauer & Khinast, 2015). O aumento de escala não é direto, principalmente para a cristalização de proteínas, pois a estrutura e qualidade dos cristais é fortemente dependente das condições do processo (Neugebauer & Khinast, 2015). No geral, parâmetros como a velocidade de agitação e a potência média são usados como critérios para o *scale-up* de tanques agitados operados em *batch*. No entanto, a utilização da velocidade de agitação como critério de *scale-up* não é o mais adequado, pois o tempo de mistura e as tensões de corte variam muito dependendo da escala (Neugebauer & Khinast, 2015). Portanto, o *scale-up* é geralmente realizado através da extrapolação dos dados obtidos no laboratório, tentando controlar o nível de sobressaturação e mantendo o tempo de cristalização e a configuração do cristalizador.

Estudos sobre a cristalização da lisozima em tanques agitados com volumes diferentes (1 L, 100 e 6 mL), verificaram que a dissipação de energia local máxima no tanque agitado é comparável em todos os volumes testados, demonstrando que pode ser usado com critério para o *scale-up* (Smejkal et al., 2013).

Para cristalizadores de escala reduzida (micro e meso escala), o *scale-up* tem sido implementado através da operação em paralelo de várias unidades (*scale-out/number-up*), mantendo-se assim a configuração do cristalizador (Jongen et al., 2003).

4 Materiais e Métodos

4.1 Materiais

Soluções de lisozima (Fluka-62971, lot. No. BCBV4043, Sigma-Aldrich) de 100, 50 e 40 g·L⁻¹ e soluções de agente precipitante, cloreto de sódio NaCl (99,5 %, Panreac AppliChem), de 14, 12, 10, 8, 6, 4, 2 %(p/v) foram preparadas numa solução tampão de acetato de sódio tri-hidratado (99,5 %, Sigma-Aldrich) 0,2 M e pH = 4,7 (T = 20°C). As soluções foram preparadas com o dobro da concentração inicial pretendida. A solução tampão foi preparada em água ultrapura (água Milli Q, resistividade de 18,3 MΩ·cm a 25 °C) e foi usado ácido acético glacial (99,5 %, Merck, Alemanha) para ajustar o seu pH. O pH da solução de NaCl foi posteriormente ajustado com uma solução de hidróxido de sódio 1 M (Pronolab, Portugal). Todas as soluções foram filtradas antes de uso utilizando-se membranas de poro 0,2 μm (Sartorius stedim, Alemanha) e filtros de seringa com o mesmo tamanho de poro (VWR International, Estados Unidos da América; Minisart, França). A concentração de lisozima em solução foi determinada por espectrofotometria UV a 280 nm (ScanSpec UV-VIS, Sarspec, Portugal) usando um coeficiente de extinção de 2,64 mL·mg⁻¹·cm⁻¹ (Lin et al., 2017).

4.2 Instalação experimental

A cristalização de lisozima foi estudada em regime *batch* num tanque agitado e num reator de fluxo oscilatório (RFO) com constrições suaves de parede (CSP) (RFO-CSP), desenvolvido por um grupo de investigação do LEPABE em colaboração com o CEB (WO 2017/175207 A1, 2017). No caso do tanque agitado, foi avaliada a influência da intensidade de mistura e da concentração inicial de lisozima no processo de cristalização. Para isso foram testadas várias velocidades de agitação (100, 200 e 300 rpm) assim com diferentes concentrações iniciais de lisozima (50 e 25 g·L⁻¹) a temperatura (20 °C) e pH (4,7) constantes. As condições ótimas em termos de concentração de lisozima foram de seguida testadas no RFO-CSP.

4.2.1 Tanque Agitado

A Figura 4-1 representa a instalação experimental usada para as experiências realizadas no tanque agitado. A instalação é constituída por um tanque agitado, um banho termostático (HUBERTM Ministat 125, Alemanha) e um agitador metálico associado a um motor de agitação (CAT R50). O tanque agitado tem um volume total de 250 mL, mas o volume usado foi de 50 mL, sendo usados volumes idênticos de solução de lisozima e de solução de NaCl. O tanque é também equipado com uma camisa de arrefecimento/aquecimento. O agitador foi ligeiramente

desviado do eixo central de modo a permitir a retirada de amostras. Várias amostras foram retiradas ao longo do tempo para medir a concentração de lisozima em solução por espectrofotometria.

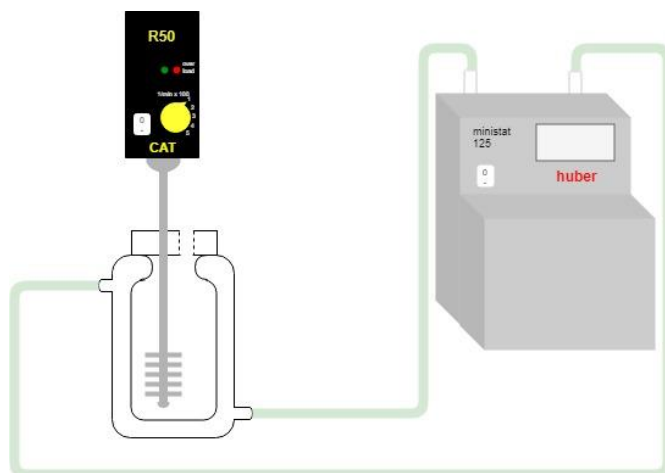


Figura 4-1. Instalação experimental para o tanque agitado

4.2.2 RFO-CSP

A instalação experimental usada para as experiências realizadas no RFO-CSP está representada na Figura 4-2. As soluções de lisozima e NaCl foram alimentadas ao reator recorrendo a uma bomba de infusão (NE-4000, Estado Unidos da América), sendo que foi utilizado um caudal de $5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ de modo a evitar a formação de bolhas no reator. A oscilação do fluido é assegurada por um motor linear (LinMot, HFOI-23, Suíça), sendo a intensidade da mistura controlada pela frequência f e amplitude x_0 de oscilação. Nos ensaios utilizou-se uma frequência de 5 Hz e uma amplitude de 1 e 2 mm. O RFO-CSP foi colocado na horizontal.

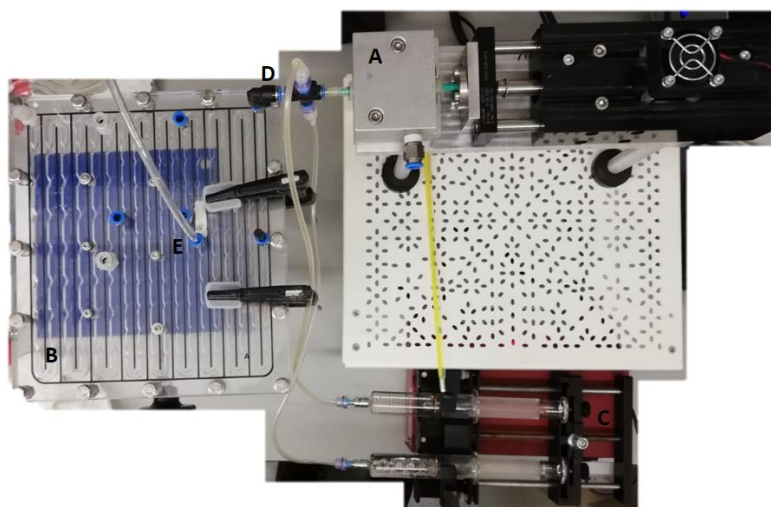


Figura 4-2. Instalação experimental para os ensaios realizados no RFO-CSP. A- motor linear; B-RFO-CSP; C- bomba de infusão; D- entrada para o reator; E - saída do reator.

Conforme se constata na Figura 4-2, apenas uma parte do RFO-CSP foi utilizada, mais concretamente até ao ponto E, tendo um volume de 30 ml, sendo alimentados ao RFO-CSP volumes idênticos de solução de lisozima e de solução de NaCl. Na **Figura 4-3** encontra-se uma representação esquemática do RFO-CSP, sendo a secção A a secção que foi usada neste trabalho.

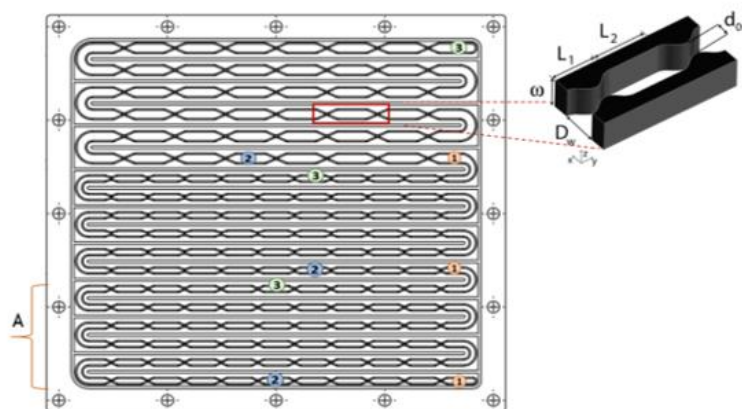


Figura 4-3.Esquema do RFO-CSP. A - Geometria utilizada nos ensaios (Almeida, 2017)

As dimensões características da geometria da secção A são apresentadas na Tabela 4-1.

Tabela 4-1. Dimensões da secção A do RFO-CSP apresentada na Figura 4-3 (Almeida, 2017)

L_1 (mm)	6,76
L_2 (mm)	12,4
d_{ow} (mm)	1,5
ω (mm)	5
D_w (mm)	4

4.3 Caracterização dos cristais

A caracterização dos cristais realizou-se por microscopia ótica (Standard 20, Zeiss, Alemanha) e o software *ImageJ* foi usado para a avaliação da morfologia e do tamanho dos cristais.

4.4 Rendimento

O rendimento foi determinado através da equação seguinte:

$$\text{Rendimento } /(\%) = \frac{C_i - C_f}{C_i - C_l^*} \times 100 \quad (4.1)$$

Onde C_i é a concentração inicial de lisozima, C_f a concentração final de lisozima e C_l^* a concentração de lisozima no equilíbrio, sendo a concentração da lisozima em solução medida por espectrofotometria UV a 280 nm (ScanSpec UV VIS, Sarspec, Portugal).

5 Resultados e Discussão

5.1 Ensaios de solubilidade

Determinou-se a variação da concentração de lisozima ao longo do tempo a pH 4,7 e a 20 °C para diferentes concentrações de NaCl (Figura 5-1). A concentração inicial de lisozima é de 20 g·L⁻¹ e para cada condição foram realizados ensaios em triplicado.

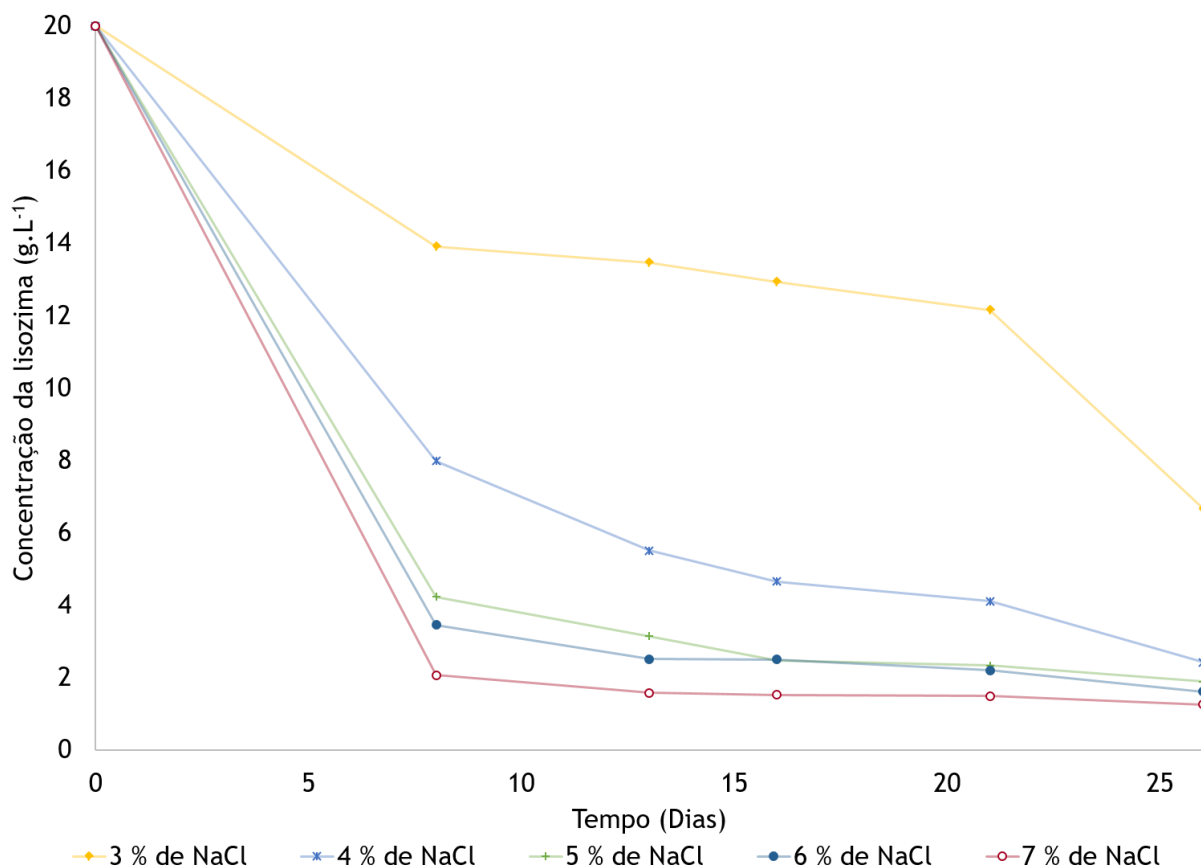


Figura 5-1. Variação da concentração de lisozima a pH 4,7 e a 20 °C a diferentes concentrações de NaCl, em %(p/v), ao longo de 26 dias

Conforme se observa na Figura 5-1, os ensaios tiveram uma duração de 26 dias, de forma que o sistema se aproxime o mais possível do equilíbrio. Na literatura aconselham-se ensaios de 2 semanas para a determinação da solubilidade (Lu et al., 2002). Verifica-se que a concentração de lisozima diminui gradualmente ao longo do tempo, sendo essa diminuição mais acentuada nos primeiros 8 dias e para concentrações mais elevadas de NaCl.

De uma forma geral, a solubilidade da lisozima diminui com a concentração de NaCl. É de referir que o erro médio associado à determinação da concentração de lisozima por espectrofotometria foi de 23,83 %. Este erro representa o desvio entre os valores esperados para

a concentração da lisozima com base na massa pesada e os valores medidos por espectrofotometria. Este desvio pode estar associado à preparação das soluções de lisozima. De facto, foram efetuadas várias diluições, o que pode acarretar erros na medição da concentração. Também se observou que o desvio era maior quanto maior a concentração de lisozima, o que poderá estar associado a uma má dissolução da lisozima.

Os valores de solubilidade obtidos para as concentrações de NaCl de 3%, 4%, 5%, 6% e 7% aproximam-se dos estimados pela equação (5.1) (Martins et al, 2008).

$$C_{\text{lisozima}} = 0,354 \times \exp\left(\frac{8,450}{C_{\text{NaCl}}}\right) \quad (5.1)$$

C_{lisozima} é a concentração de lisozima expressa em $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e C_{NaCl} é a concentração de NaCl expressa em % (p/v). Na Tabela 5-1 encontram-se os valores de solubilidade da lisozima medidos, assim como os valores determinados a partir da equação (5.1) e encontrados na literatura (Forsythe et al., 1999). No Anexo A estão disponíveis os valores da solubilidade da lisozima obtidos por Forsythe et al (1999) a diferentes temperatura, pH e concentração de NaCl.

Tabela 5-1: Comparação entre os valores medidos, os valores determinados pela equação (5.1) e os valores da literatura (Forsythe et al., 1999) para a solubilidade da lisozima a diferentes concentrações de NaCl, a $T = 20^\circ\text{C}$ e pH 4.7

Concentração de NaCl (%(p/v))	Solubilidade da lisozima medida ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)*	Solubilidade da lisozima pela equação (5.1) ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Solubilidade da lisozima por Forsythe et al. (1999) ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
3	$6,66 \pm 0,29$	5,92	7,41
4	$2,43 \pm 0,34$	2,93	2,84
5	$1,90 \pm 0,13$	1,92	1,83
6	$1,62 \pm 0,14$	1,45	1,52
7	$1,26 \pm 0,07$	1,18	1,20

* Os erros associados à solubilidade correspondem aos desvios-padrão de pelo menos três ensaios

Conforme se pode verificar na Tabela 5-1, os valores medidos são muito próximos dos valores obtidos através da equação (5.1) e dos valores da literatura.

5.2 Tanque agitado

Nesta parte do trabalho foi avaliada a influência da velocidade de agitação assim como da concentração de lisozima no processo de cristalização da lisozima num tanque agitado a 20°C , pH 4,7 e uma concentração de NaCl de 3 %(p/v). Para isso foram retiradas amostras ao longo do tempo de forma a medir concentração da lisozima em solução e caracterizar a morfologia e

tamanho dos cristais formados. Foram realizados pelo menos três ensaios para todas as condições estudadas.

5.2.1 Perfil de concentração da lisozima

Os perfis de concentração da lisozima para a concentração inicial de lisozima de $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, e para as velocidades de agitação de 100, 200 e 300 rpm são apresentados na Figura 5-2. No Anexo B -Perfis de concentração estão disponíveis os perfis de concentração para todos os ensaios realizados.

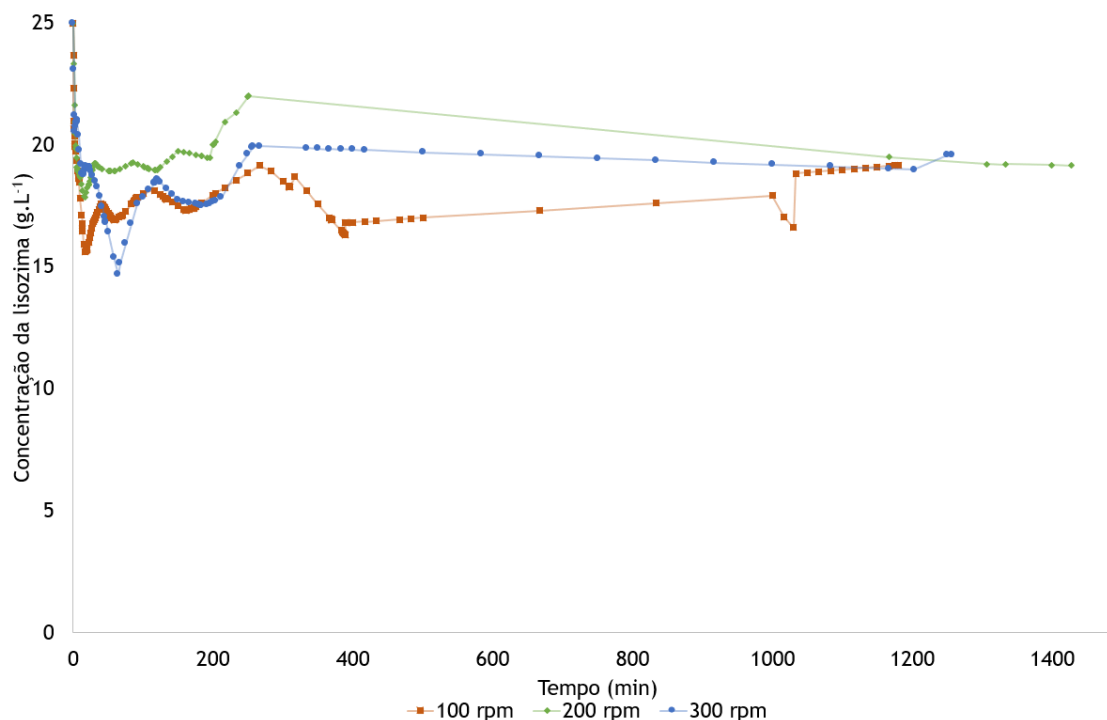


Figura 5-2. Perfil de concentração da lisozima para a concentração inicial de $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e para as velocidades de agitação de 100, 200 e 300 rpm.

Na Figura 5-2 observa-se que os perfis de concentração para as diferentes velocidades de agitação são semelhantes. No início do processo de cristalização, a concentração de lisozima sofre uma diminuição acentuada. Essa diminuição pode ser explicada pela ocorrência da nucleação, e dado o curto espaço de tempo decorrido desde o início do processo ocorreu provavelmente nucleação heterógena. De seguida, a concentração estabiliza. No final, os três perfis de concentração convergem para o mesmo valor. Verifica-se também algumas oscilações na concentração de lisozima que poderão estar associadas ao erro experimental. De fato, a preparação das soluções de lisozima para a determinação da sua concentração por espectrofotometria requer várias diluições.

Smejkal et al, (2013) também mediram o perfil de concentração da lisozima para uma concentração inicial de lisozima de $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ num tanque agitado de 1 L e para velocidades de agitação de 50 e 200 rpm. O agente precipitante foi o NaCl (4 % (p/v)) e mantiveram a

temperatura a 20 °C e o pH a 4. A 200 rpm, a concentração de lisozima só sofreu uma diminuição acentuada após aproximadamente 4 horas. Ao final de 24 horas a concentração de lisozima foi de aproximadamente de 8 g·L⁻¹. Comparando com o ensaio a 200 rpm, a concentração de lisozima diminui nos primeiros minutos e o seu valor após cerca de 24 horas é de aproximadamente 19 g·L⁻¹, muito acima da solubilidade medida 6,66 g·L⁻¹. Esta diferença poderá estar associada ao tipo de agitador utilizado, uma vez que, o agitador poderá estar a promover a nucleação.

Na Figura 5-3 é representado o perfil de concentração da lisozima para a concentração inicial de lisozima de 50 g·L⁻¹, e para diferentes velocidades de agitação (100, 200 e 300 rpm).

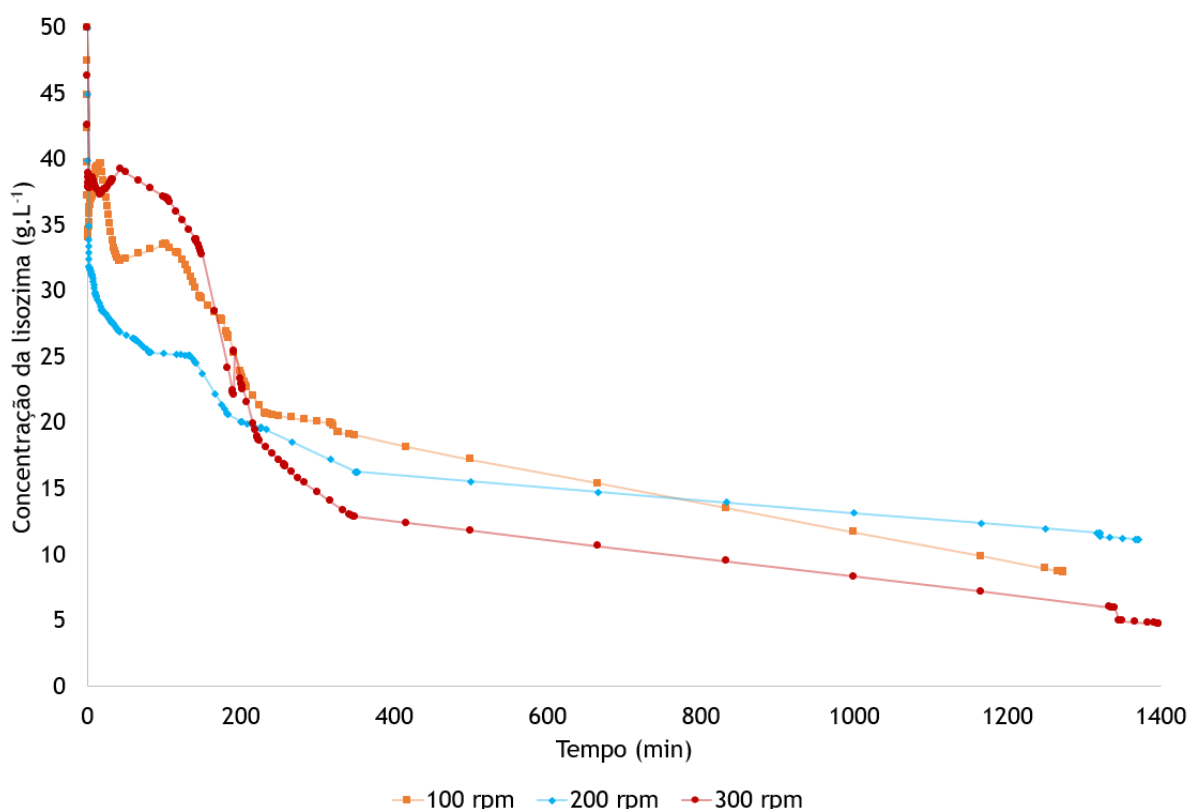


Figura 5-3. Perfis de concentração da lisozima para a concentração inicial de lisozima de 50 g·L⁻¹ e para as velocidades de agitação de 100, 200 e 300 rpm

Conforme se verifica na Figura 5-3, os perfis de concentração são muito semelhantes para as diferentes velocidade de agitação estudadas, à exceção dos primeiros minutos em que se observa um abaixamento mais acentuado da concentração de lisozima para 200 rpm. É possível identificar duas zonas com diminuição acentuada da concentração de lisozima, que poderá indicar a ocorrência de dois eventos de nucleação, provavelmente uma primeira nucleação heterógena seguida de uma nucleação secundária. Observa-se ainda que as concentrações finais estão acima da concentração de equilíbrio (6,6 g·L⁻¹).

5.2.2 Morfologia e tamanho dos cristais

Várias amostras foram recolhidas ao longo do tempo de forma a caracterizar os cristais formados em termos de morfologia e tamanho. Para isso, os cristais foram observados por microscopia ótica ($\times 11,25 \times 10$) e as imagens foram analisadas recorrendo ao *software* ImageJ. Na Figura 5-4 são identificados os pontos onde foram retiradas as amostras para a concentração inicial de lisozima de $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

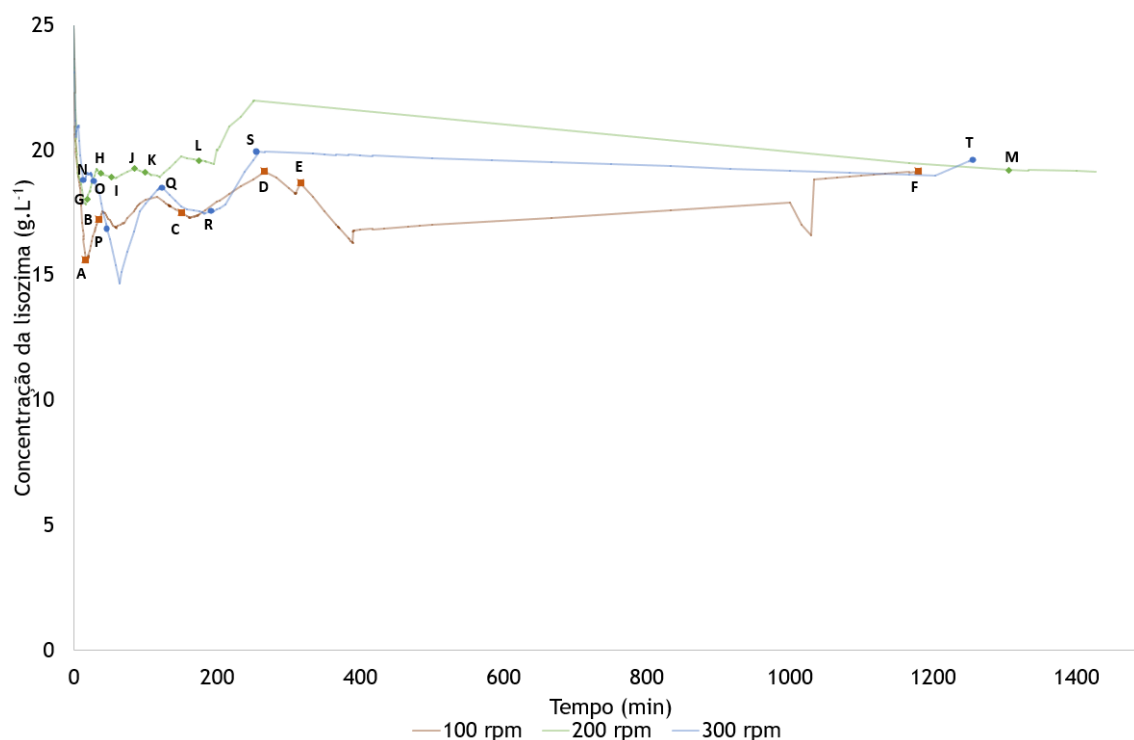


Figura 5-4. Pontos em que as amostras foram retiradas durante a cristalização de lisozima para a concentração inicial de $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e velocidades de agitação de 100, 200 e 300 rpm.

Os pontos de A até F correspondem à cristalização de lisozima que ocorreu a 100 rpm, de G até M a de 200 rpm e de N até T o processo de cristalização a 300 rpm. Nas Figura 5-5, Figura 5-6 e Figura 5-7 são apresentadas as imagens das amostras correspondentes aos pontos identificados na Figura 5-4.

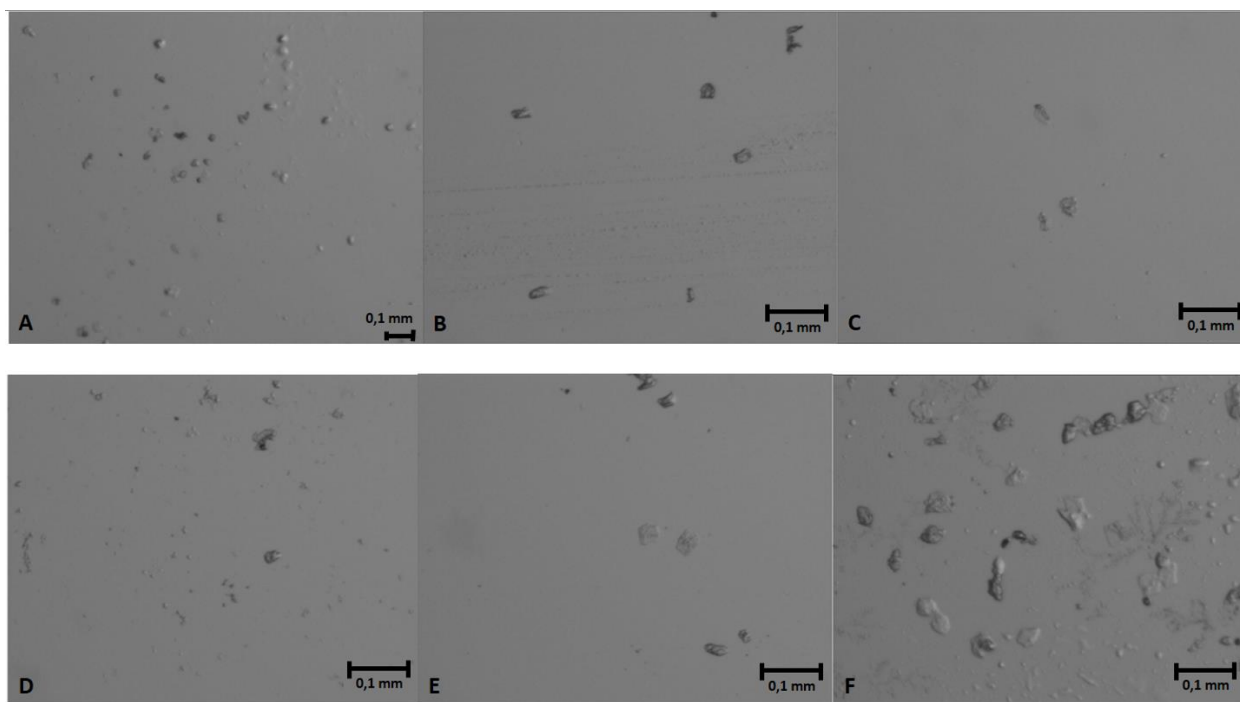


Figura 5-5. Imagens dos cristais de lisozima obtidos na cristalização da lisozima para a concentração inicial de $25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ e velocidade de agitação de 100 rpm

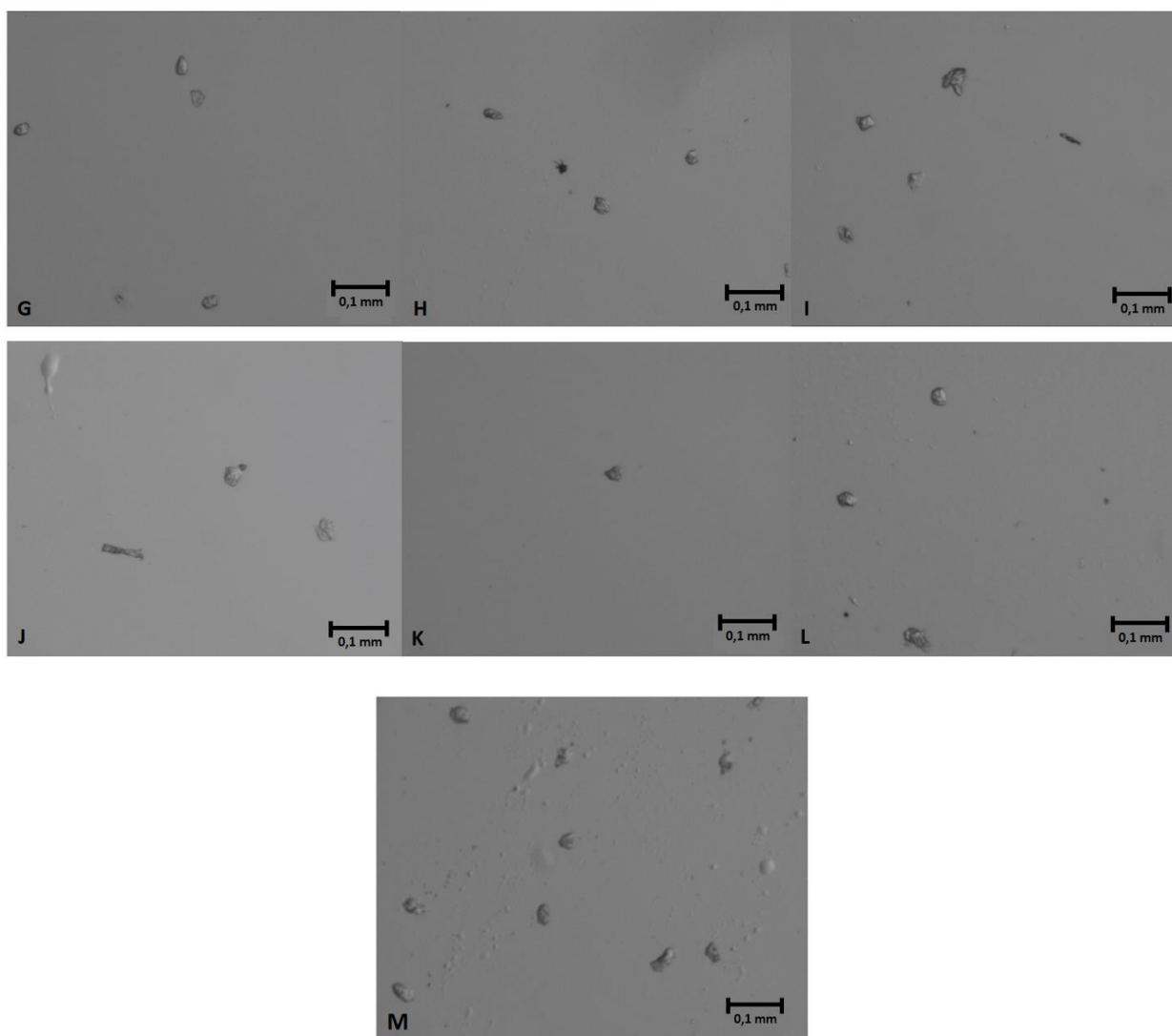


Figura 5-6. Imagens dos cristais de lisozima obtidos na cristalização da lisozima para a concentração inicial de $25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ e velocidade de agitação de 200 rpm

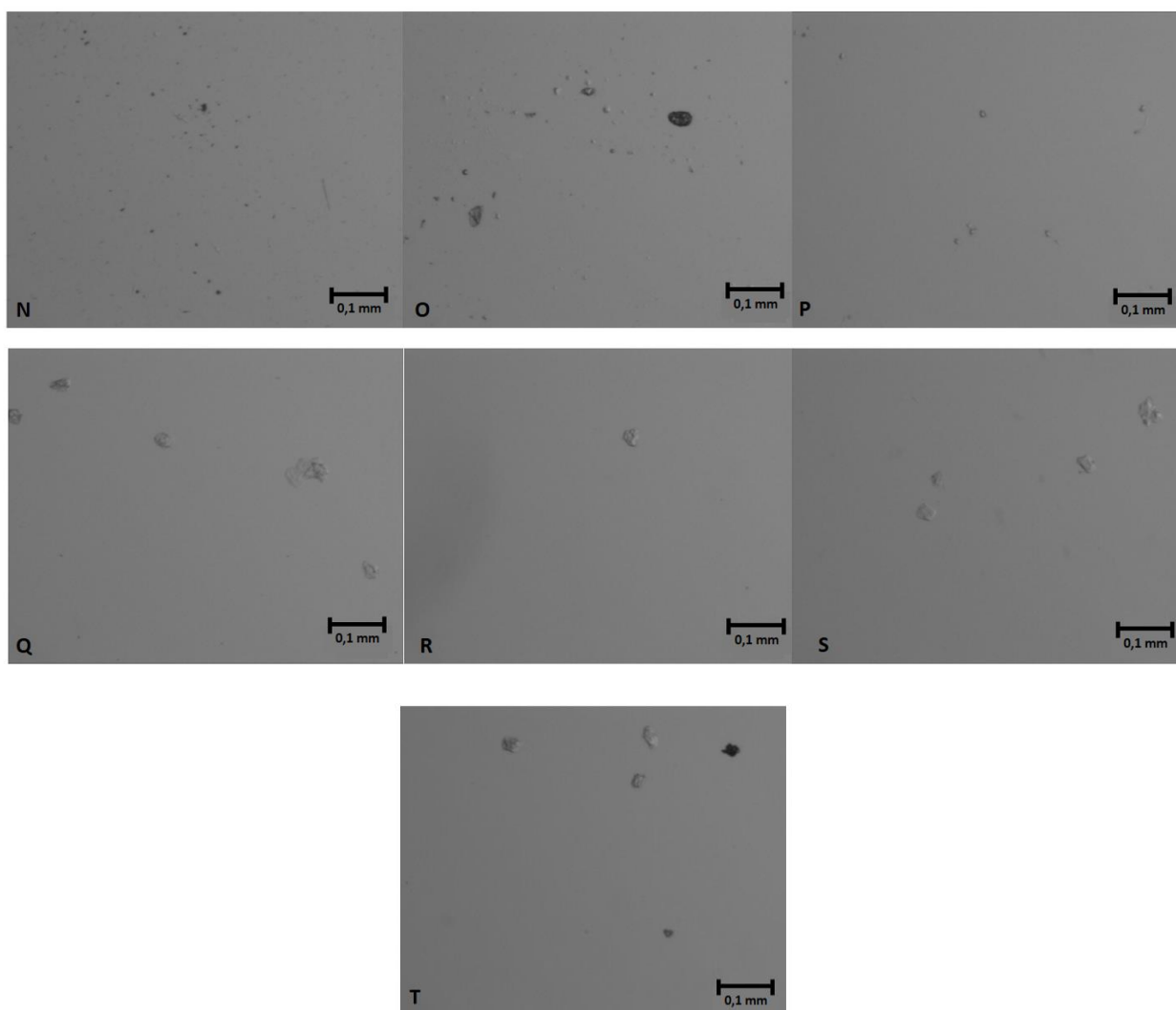


Figura 5-7. Imagens dos cristais de lisozima obtidos na cristalização da lisozima para a concentração de $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e velocidade de 300 rpm.

Pelas Figura 5-5, Figura 5-6 e Figura 5-7 observa-se que para as diferentes velocidades de agitação os cristais formam-se ao fim de poucos minutos. Estes resultados vão de encontro aos perfis de concentração, sugerindo mais uma vez que estamos provavelmente perante uma nucleação heterogênea.

Os cristais de lisozima podem apresentar vários tipos de morfologia, desde tetragonal, ortorrômbico e agulha (Ewing et al., 1994; Forsythe et al., 1999; Heijna et al, 2007). Para estas condições de pH, temperatura e concentração de NaCl, a morfologia dos cristais deveria ser tetragonal (Forsythe et al., 1999). Tendo em conta as Figura 5-5, Figura 5-6 e Figura 5-7, os cristais aproximam-se mais da morfologia tetragonal.

De uma forma geral, para a concentração inicial de lisozima de $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, formam-se poucos cristais, o que dificulta a análise do tamanho dos cristais. Na Tabela 5-2 encontram-se os valores típicos dos tamanhos dos cristais formados em diferentes momentos (conforme

ilustrado na Figura 5-4) e para diferentes velocidades de agitação. Os tamanhos típicos apresentados correspondem ao diâmetro de Ferret.

Tabela 5-2. Evolução do tamanho típico dos cristais de lisozima ao longo do processo de cristalização para uma concentração de lisozima inicial de $25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ e a diferentes velocidades de agitação. As letras designam diferentes pontos, identificados nos perfis de concentração, que correspondem a diferentes tempos

Tamanho típico (μm)					
100 rpm		200 rpm		300 rpm	
A	8	G	26	N	3
B	27	H	31	O	12
C	28	I	32	P	11
D	33	J	28	Q	31
E	34	K	30	R	36
F	42	L	31	S	30
		M	31	T	35

Com base nos perfis de concentração apresentados na Figura 5-4, verifica-se que após a diminuição inicial da concentração há logo formação de cristais, independentemente da velocidade de agitação. Ao longo do tempo, não há grande variação na concentração de lisozima e os cristais não apresentam um crescimento evidente. Isto verifica-se claramente na Tabela 5-2, a partir de um determinado ponto (B, H, Q) o tamanho típico dos cristais de lisozima não varia muito. Acrescenta-se ainda que todos os cristais obtidos no final apresentam um tamanho típico muito próximo para as diferentes velocidades de agitação.

Smejkal et al,(2013) estudaram a cristalização da lisozima para diferentes velocidades de agitação (50, 100 e 200 rpm) e verificaram que a 200 rpm os cristais são mais uniformes e apresentam menos agregação. Contudo, os resultados obtidos não evidenciam diferenças significativas na morfologia e tamanho dos cristais para as várias velocidades de agitação estudadas.

Na Figura 5-8 são identificados os pontos onde foram retiradas as amostras para a concentração inicial de lisozima de $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

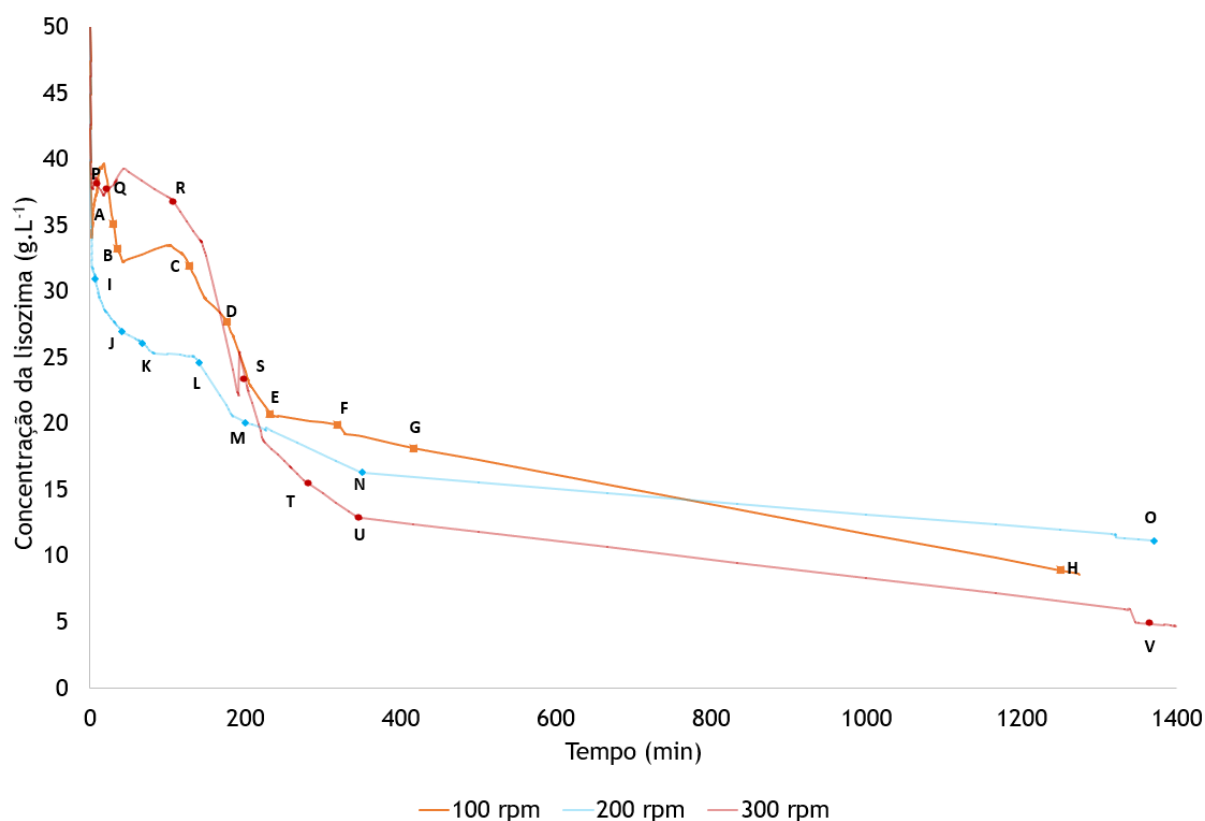


Figura 5-8 Pontos em que as amostras foram retiradas durante a cristalização de lisozima para a concentração inicial de $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e velocidades de agitação de 100, 200 e 300 rpm.

Os pontos de A até H correspondem à cristalização de lisozima que ocorreu a 100 rpm, do ponto I até ao ponto O corresponde a de 200 rpm, por fim, do ponto P até ao ponto V corresponde ao processo de cristalização a 300 rpm. Nas Figura 5-9, Figura 5-10 e Figura 5-11 são apresentadas as imagens correspondente às amostras retiradas para as diferentes velocidades.

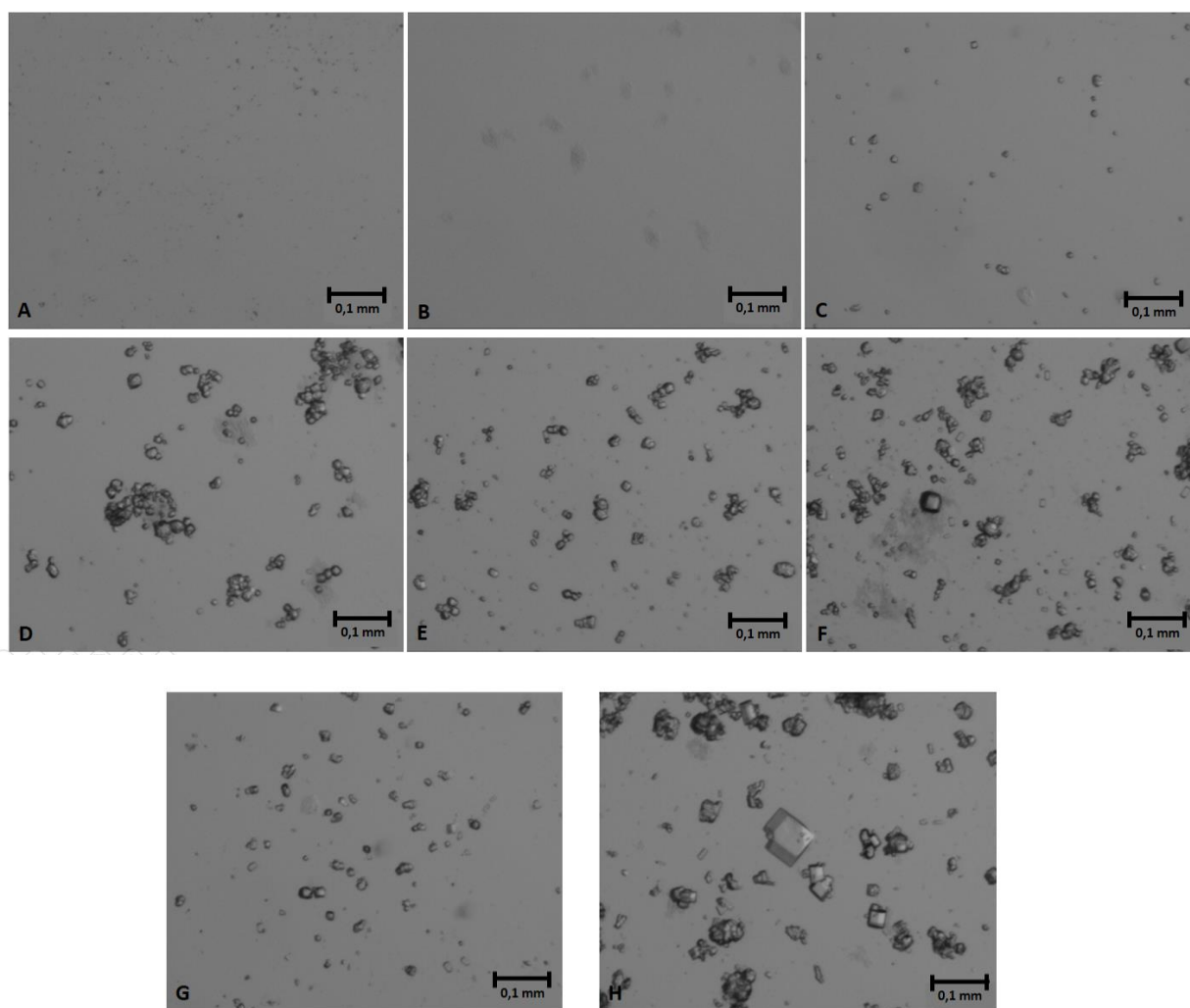


Figura 5-9. Imagens dos cristais de lisozima obtidos na cristalização da lisozima para a concentração inicial de $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ e velocidade de agitação de 100 rpm

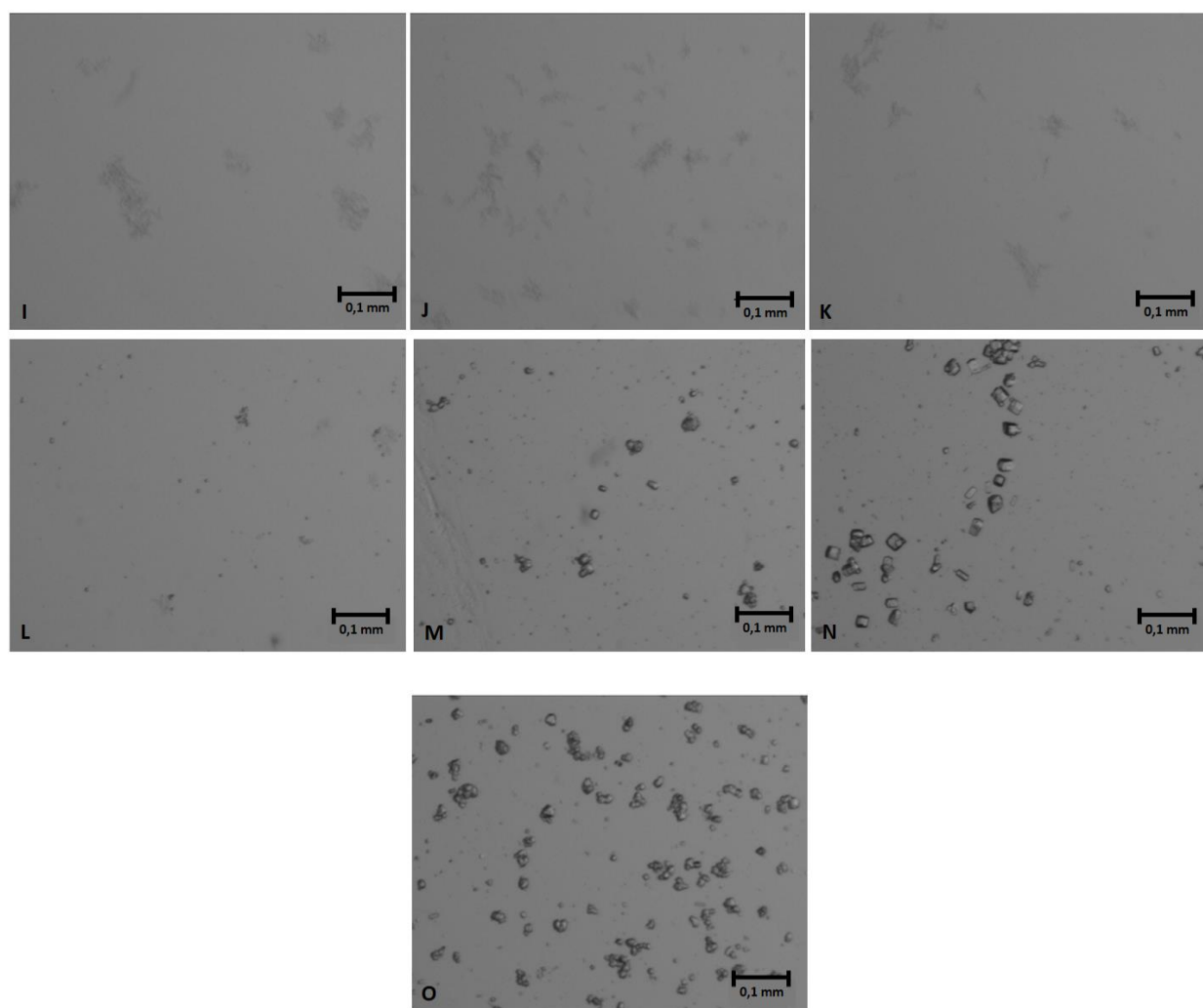


Figura 5-10. Imagens dos cristais de lisozima obtidos na cristalização da lisozima para a concentração inicial de $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e velocidade de agitação de 200 rpm

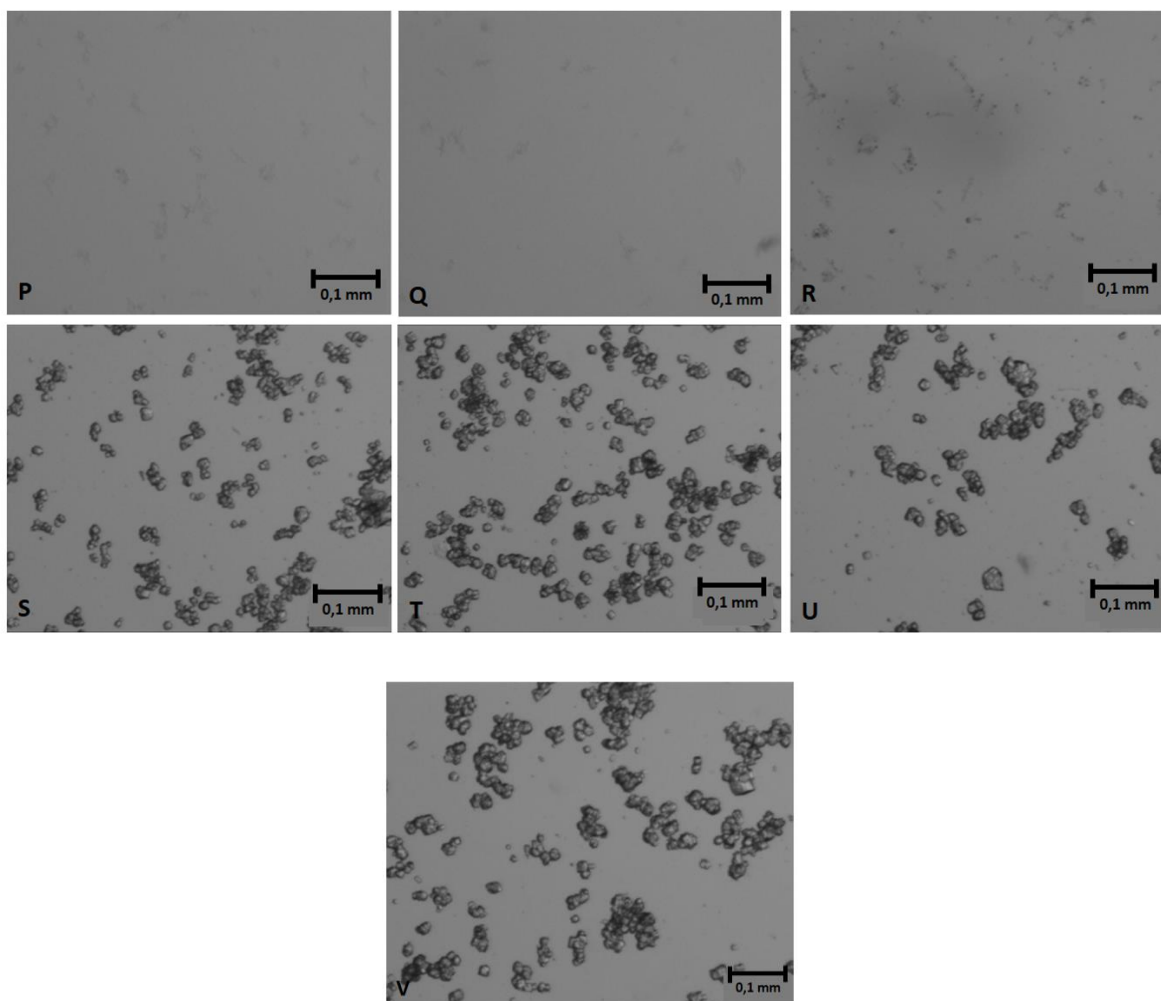


Figura 5-11. Imagens dos cristais de lisozima obtidos na cristalização da lisozima para a concentração inicial de $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e velocidade de agitação de 300 rpm

As Figura 5-9, Figura 5-10 e Figura 5-11 demonstram a existência de dois momentos distintos, também evidenciados nos perfis de concentração (Figura 5-8). Após a primeira diminuição da concentração de lisozima em solução, há presença de agregados amorfos (pontos A, B, I, J, K, L, P, Q). De seguida, há novamente uma diminuição da concentração de lisozima em solução, que poderá ser justificada em parte pelo crescimento dos cristais, conforme se observa nos pontos D, E, F, G, H, M, N, O, S, T, U e V. Além disso, verifica-se a presença de cristais de diferentes tamanhos numa mesma amostra (pontos D, M e S). Isto pode ser explicado pela ocorrência de nucleação secundária, que poderá também justificar a segunda diminuição da concentração de lisozima. Relativamente à morfologia, os cristais apresentam uma forma tetragonal para todas as condições estudadas.

Observa-se ainda alguma agregação em todos os ensaios realizados, que está provavelmente relacionada com o pequeno tamanho dos cristais. Segundo Kwon et al. (2014), a agregação de cristais de lisozima com tamanhos entre $1\text{-}50 \mu\text{m}$ ocorre sobretudo devido às

tensões de corte. Quando os cristais são submetidos a tensões de cortes a colisão entre os cristais é promovida, levando a agregação (Masy & Cournil, 1991).

Na Tabela 5-3 encontram-se os valores típicos dos tamanhos dos cristais para a concentração inicial de lisozima de $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, em diferentes momentos e para diferentes velocidades de agitação, conforme a Figura 5-8.

Tabela 5-3. Evolução do tamanho típico dos cristais de lisozima ao longo do processo de cristalização para uma concentração de lisozima inicial de $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e a diferentes velocidades de agitação. As letras designam diferentes pontos, identificados nos perfis de concentração, que correspondem a diferentes tempos

Tamanho típico (μm)					
100 rpm		200 rpm		300 rpm	
A	-	I	-	P	-
B	-	J	-	Q	-
C	14	K	-	R	-
D	22	L	5	S	26
E	23	M	19	T	26
F	23	N	26	U	28
G	25	O	29	V	26
H	40				

O tamanho típico dos cristais no caso das velocidades de agitação de 100 e 200 rpm corresponde ao tamanho típico dos cristais de maior dimensão, uma vez que o tamanho reduzido de alguns cristais impediu a sua medição por análise de imagem. O mesmo não acontece com os cristais obtidos a 300 rpm, que aparentam ser de tamanho mais uniforme.

Comparando os processos de cristalização para as duas concentrações iniciais de lisozima, formaram-se mais cristais e de tamanho menor para os ensaios com $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Quanto maior a concentração inicial de lisozima, maior é a sobressaturação inicial, e consequentemente, mais rápida é a nucleação, levando à formação de um elevado número de cristais pequenos.

5.2.3 Rendimento

Na Tabela 5-4 são apresentados os rendimentos para as diferentes velocidades de agitação e concentrações iniciais de lisozima.

Tabela 5-4. Rendimento para as diferentes concentrações iniciais de lisozima e diferentes velocidades de agitação

Velocidade de agitação (rpm)	Concentração inicial de lisozima ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Rendimento* (%)	Desvio-padrão**
100	25	31	6
	50	91	0
200	25	26	-
	50	84	0
300	25	18	3
	50	99	4

*O rendimento foi calculado pela equação (4.1), utilizando-se como concentrações finais de lisozima as concentrações em solução após 20 h.

** O desvio padrão foi calculado a partir de pelo menos três ensaios

Analisando a Tabela 5-4, o processo de cristalização realizado com a concentração inicial de $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ apresenta maiores rendimentos quando comparado com a concentração de $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Smejkal et al. (2013) obtiveram um rendimento de 76 %, aproximadamente, para a concentração inicial de lisozima de $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e 200 rpm.

Para a concentração inicial de lisozima de $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e 200 rpm, apenas um dos ensaios foi prolongado por mais de 20 h, não sendo possível calcular o desvio padrão.

Para a mesma concentração inicial, o aumento da velocidade da agitação não levou a alterações significativas no perfil de concentrações nem na morfologia e tamanho dos cristais. Assim, a agitação não mostrou ter uma influência significativa no processo. Este resultado vai de encontro a alguns estudos realizados, que demonstram que, para o caso da lisozima, a cristalização é controlada pelo processo de integração (Weichsel et al, 2017). No entanto, Smejkal et al. (2013) verificaram que o tempo necessário para o início da cristalização pode ser reduzido, aumentando a agitação. Mas, a partir de uma determinada velocidade, o aumento da agitação não resulta na diminuição desse tempo, sugerindo assim a existência de uma velocidade de agitação ótima.

No que diz respeito à concentração inicial de lisozima, observaram-se diferenças nos perfis de concentração. Para a concentração de $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ não se atingem concentrações tão baixas como na concentração de $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, logo, o rendimento é muito menor no primeiro caso. Além disso, os resultados sugerem que a nucleação é mais forte para a maior concentração inicial, tendo-se verificado um decréscimo mais acentuado da concentração de lisozima e a formação de um maior número de cristais.

5.3 RFO-CSP

Nesta parte do trabalho foi feito um estudo preliminar da cristalização da lisozima num RFO-CSP, para uma concentração inicial de lisozima de $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ a 20°C , pH 4,7 e uma concentração de NaCl de 3 % (p/v). Almeida (2017) analisou o perfil de escoamento e de mistura no mesmo RFO-CSP, chegando à conclusão que a frequência (f) e amplitude (x_0) de oscilação que permitem uma mistura eficiente e uma dispersão axial reduzida são de 5 Hz e 2 mm, respetivamente. Assim, foram realizados ensaios com essas condições de oscilação. Posteriormente, manteve-se a frequência e reduziu-se para metade a amplitude.

No anexo D estão disponíveis as ondas sinusoidais utilizadas para a obtenção da amplitude pretendida no RFO-CSP. Sempre que se fala em amplitude, é referente ao deslocamento que ocorre na parte sem constrições do RFO-CSP.

5.3.1 Tamanho dos cristais

Na Figura 5-12 encontram-se imagens relativas às amostras finais obtidas no RFO-CSP para as duas amplitudes estudadas.

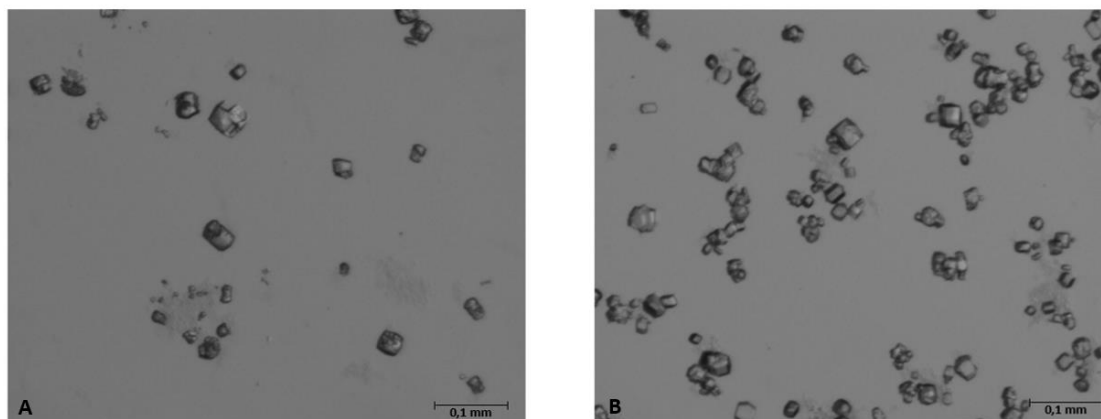


Figura 5-12. Observação na lupa da amostra final no RFP-CSP: A) $x_0 = 1,0 \text{ mm}$; B) $x_0 = 2,0 \text{ mm}$

Observando a Figura 5-12, verifica-se que para ambas as amplitudes existem cristais de diferentes dimensões com um formato tetragonal, sugerindo a ocorrência de nucleação secundária. Verifica-se ainda um número maior de cristais para a maior amplitude. Além disso, a agregação aparenta ser mais acentuada para a maior amplitude.

Ao fim de 3 e 10 minutos, aproximadamente, a solução aparentava estar mais turva, para a amplitude de 1,0 e 2,0 mm, respetivamente. Este curto espaço de tempo poderá indicar que ocorreu nucleação heterogénea.

Castro et al. (2018) determinaram a distribuição do tamanho dos cristais de lisozima para várias amplitudes (3,6, 5,3 e 7,6 mm) e frequências (1,33, 1,82 e 2,33 Hz). O tamanho médio dos cristais variou entre 14,1 e 34,6 μm , e em todos os ensaios foram obtidos cristais tetragonais.

Na Tabela 5-5 são apresentados os tamanhos típicos dos cristais nas amostras finais para as diferentes amplitudes, ao fim de 200 minutos.

Tabela 5-5. Tamanho típico dos cristais obtidos no RFO-CSP

	Tamanho típico (μm)	
	$x_0 = 1 \text{ mm}$	$x_0 = 2 \text{ mm}$
Amostra Final	38	34

O tamanho típico dos cristais para as duas amplitudes é muito próximo. A grande diferença destas duas amplitudes está relacionada com o número de cristais, que aparenta ser maior para a maior amplitude (Figura 5-12).

Na Figura 5-13 é possível comparar a mistura no RFO-CSP nas amplitudes de x_0 de 1,0 e 2,0 mm. Mais imagens para o RFO-CSP encontram-se no Anexo F.

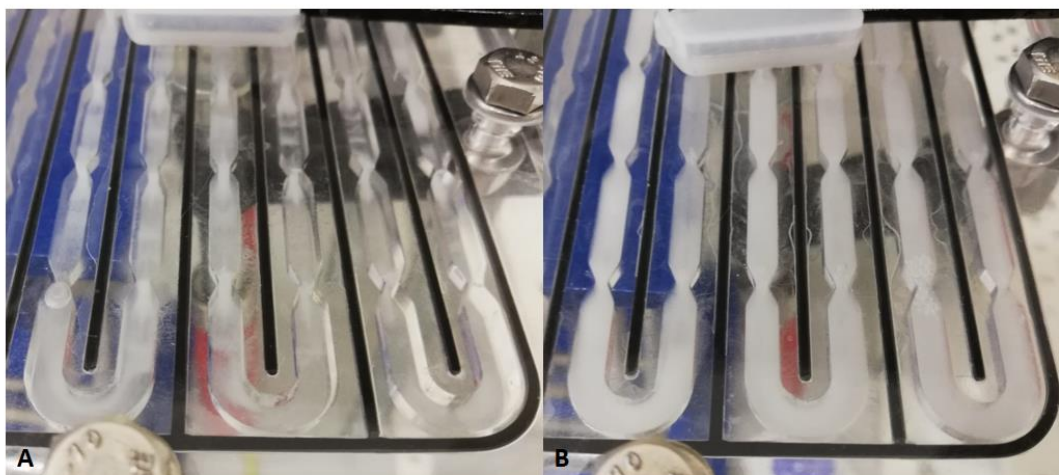


Figura 5-13. Mistura no meso-reator: A- para $x_0 = 1,0 \text{ mm}$; B- para $x_0 = 2,0 \text{ mm}$

Na Figura 5-13A observa-se que existem zonas com maior concentração de cristais, sobretudo nas constrições, observando-se cristais depositados. Na Figura 5-13B da esquerda para a direita há uma ligeira diminuição na turbidez da solução. Segundo Ejim et al. (2017) é preferível uma frequência alta e uma amplitude baixa quando se pretende manter sólidos em suspensão. Neste caso, os resultados demonstram que é preferível a amplitude de 2,0 mm, pois todos os cristais são mantidos em suspensão.

5.3.2 Rendimento

No Anexo E são apresentados todos os valores obtidos, nos diferentes ensaios, que permitiram determinar a concentração final média e o rendimento. Na Tabela 5-6, são apresentados os resultados, concentração final e rendimento, associado ao RFO-CSP, nas condições de x_0 de 1 mm e 2 mm, para a mesma frequência, 5 Hz.

Tabela 5-6. Resultados do RFO-CSP, para $f = 5$ Hz, $x_0 = 1$ mm e $x_0 = 2$ mm

x_0 (mm)	Tempo (min)	Concentração média final ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Rendimento (%)*
1	203	21,7	50 ± 10
2		14,4	74 ± 9

* O desvio padrão foi calculado a partir de pelo menos três ensaios

De acordo com a Tabela 5-6, o rendimento é maior para a maior amplitude. Este resultado vem corroborar os resultados apresentados na Figura 5-13 em que se verifica um maior número de cristais para a maior amplitude. Castro et al. (2018) estudaram a influência da intensidade de mistura num meso RFO (WO 2015/056156 A1, 2015) na cristalização de lisozima, utilizando diferentes amplitudes e frequências, sendo que o rendimento obtido foi de 72 % e 64 %, para as condições de $x_0 = 3,6$ mm e $f = 1,83$ Hz e $x_0 = 7,6$ mm e $f = 1,83$ Hz, respetivamente. Estes valores de rendimento são muito próximos aos obtidos no presente trabalho, 50 % e 74 %. É de salientar que as condições operatórias são distintas (amplitude e frequência), mas foram selecionadas para comparação com os resultados obtidos, uma vez que apresentam um Re_0 próximo das condições operatórias estudadas, 125 e 251 para a amplitude de 1 e 2 mm, respetivamente.

5.4 Comparação entre o desempenho do tanque agitado e do RFO-CSP

Quando comparamos as características dos cristais obtidos no tanque agitado e no RFO-CSP, verifica-se que os cristais obtidos nos dois reatores são semelhantes em termos de tamanho e morfologia. Em ambos os reatores, ocorreu a formação de agregados, devido ao pequeno tamanho dos cristais. Contudo a existência de agregados é desfavorável para as etapas seguintes à cristalização (filtração...) (Smejkal et al., 2013).

A mistura da solução foi melhor no RFO-CSP, pois para a maior amplitude não se verificou a deposição de cristais no fundo do reator. Já no tanque agitado, para a velocidade mais alta, 300 rpm, havia muitos cristais depositados, sobretudo passado algumas horas desde o início do processo.

De forma a comparar o rendimento no tanque agitado e no RFO-CSP, está representado na Tabela 5-7, o rendimento obtido em ambos os casos para a concentração inicial de lisozima de $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, considerando o tempo de três horas e 23 minutos, uma vez que o processo no RFO-CSP só decorreu até a esse momento.

Tabela 5-7. Rendimento no Tanque Agitado e no RFO-CSP para a concentração inicial de lisozima de $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, para os primeiros 203 minutos.

	Agitação	Rendimento (%)*
RFO	$x_0 = 1,0 \text{ mm}$	50 ± 10
	$x_0 = 2,0 \text{ mm}$	74 ± 9
Tanque agitado	100 rpm	45 ± 9
	200 rpm	65 ± 9
	300 rpm	65 ± 9

* O desvio padrão foi calculado a partir de pelo menos três ensaios

Na Tabela 5-7 observa-se que para o tempo considerado o rendimento é semelhante para os dois reatores.

6 Conclusões

No presente trabalho fez-se um estudo comparativo da cristalização da lisozima num tanque agitado e num RFO-CSP. No tanque agitado foram estudadas duas concentrações iniciais de lisozima e três velocidades de agitação, sendo que depois, as melhores condições de concentração foram utilizadas no RFO-CSP.

No caso do tanque agitado, os resultados demonstram que a velocidade de agitação não exerce uma influência significativa na cristalização da lisozima, para as condições estudadas. Para além disso, os resultados sugerem a ocorrência de nucleação heterógena para as duas concentrações iniciais de lisozima estudadas. Os resultados poderão indicar ainda a ocorrência de nucleação secundária para a concentração inicial de lisozima mais elevada. Quanto à influência da concentração inicial de lisozima, constatou-se a formação de um maior número de cristais para a maior concentração inicial de lisozima, o que era expectável uma vez que uma maior sobressaturação leva a uma nucleação mais rápida e consequentemente à formação de um maior número de cristais.

Os resultados preliminares no RFO-CSP demonstraram uma mistura mais eficiente para a amplitude de 2 mm. Contudo, os cristais obtidos para as duas amplitudes estudadas apresentam características semelhantes em termos de morfologia e tamanho. Além disso, em ambas as amplitudes ocorreu nucleação heterogénea e secundária, uma vez que, as amostras apresentam cristais de tamanho diferente.

Comparando o desempenho do tanque agitado e do RFO-CSP, foi possível obter em ambos os reatores cristais de lisozima de morfologia e tamanho semelhantes.

Embora sejam necessários estudos mais aprofundados quanto ao desempenho do RFO-CSP, os resultados deste estudo demonstram a sua viabilidade na cristalização de proteínas.

7 Avaliação do trabalho realizado

7.1 Objetivos Realizados

No decorrer do trabalho foram cumpridos os seguintes objetivos:

- Determinação da solubilidade da lisozima para diferentes concentrações de NaCl
- Estudo do efeito da concentração e da velocidade de agitação no processo de cristalização de lisozima realizado num cristalizador do tipo tanque agitado, em regime *batch*
- Estudo comparativo entre o tanque agitado e um RFO-CSP tendo por base a melhor condição no tanque agitado, ambos em regime *batch*.
- Caracterização do tamanho típico e morfologia dos cristais de lisozima, nas diferentes condições de concentração e agitação, para o tanque agitado. No RFO-CSP, caracterizou-se o tamanho típico e a morfologia dos cristais de lisozima, para duas amplitudes.

7.2 Apreciação Final

Os ensaios realizados no âmbito da dissertação oferecem resultados limitados no que diz respeito à cinética de nucleação, não sendo possível obter parâmetros como tempo de indução (tempo de nucleação). Como trabalho futuro sugere-se a utilização de outro tipo de agitador, uma vez que os resultados sugerem que o agitador utilizado poderá promover a nucleação. A utilização de sementeira é também indicada para ultrapassar o problema inicial da nucleação, e assim, conseguir um maior controlo sobre as características dos cristais.

No que diz respeito ao tamanho típico dos cristais, a sua determinação foi realizada manualmente. Algumas das amostras recolhidas apresentavam um número reduzido de cristais, tornando-se inviável a análise estatística da distribuição de tamanhos. Em outras amostras, o número de cristais por imagem era demasiado elevado, impossibilitando a determinação da distribuição de tamanho recorrendo a um programa de análise de imagem. Neste caso é aconselhável diluir a amostra numa solução saturada de lisozima de forma a que não ocorra a dissolução dos cristais.

Os ensaios realizados no RFO-CSP foram insuficientes para averiguar qual a influência da intensidade de mistura sobre a cristalização da lisozima, e como tal, sugere-se como trabalhos futuros ensaios com diferentes amplitudes e frequências de oscilação.

8 Referências

- Almeida, F. (2017). *Análise de perfis de escoamento e de mistura num meso-reator de fluxo oscilatório para aplicação na indústria farmacêutica*. Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto.
- Asherie, N. (2004). Protein crystallization and phase diagrams. *Methods*, 34, 266-272.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2002). Protein Structure and Function. Em *Biochemistry* (Fifth Edit). W. H. Freeman.
- Borbón, F. (2013). *Solvent Freeze Out (SFO) Technology for Protein Crystallization - Optimization and Applicability*.
- Braatz, R. D. (2002). Advanced control of crystallization processes. *Annual Reviews in Control*, 26, 87-99.
- Castro, F., Ferreira, A., Teixeira, J. A., & Rocha, F. (2016). Protein Crystallization As a Process Step in a Novel Meso Oscillatory Flow Reactor: Study of Lysozyme Phase Behavior. *Crystal Growth and Design*, 16(7), 3748-3755.
- Castro, F., Ferreira, A., Teixeira, J. A., & Rocha, F. (2018). Influence of Mixing Intensity on Lysozyme Crystallization in a Meso Oscillatory Flow Reactor. *Crystal Growth and Design*, 18, 5940-5946.
- Chayen, N. E. (2005). Methods for separating nucleation and growth in protein crystallisation. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 88, 329-337.
- Cruz, P. (2015). *Aplicação de um novo reator de fluxo oscilatório no controlo da qualidade e tamanho dos cristais de paracetamol*. Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto.
- Ducruix, A., & Giegé, R. (1999). *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins: A practical Approach* (Second Edi). U.S.A: Oxford University Press.
- Durbin, S., Feher, G. (1996). Protein Crystallization. *Annual Review of Physical Chemistry*, 47, 171-204.
- Ejim, L. N., Yerdelen, S., McGlone, T., Onyemelukwe, I., Johnston, B., Florence, A. J., & Reis, N. M. (2017). A factorial approach to understanding the effect of inner geometry of baffled meso-scale tubes on solids suspension and axial dispersion in continuous, oscillatory liquid-solid plug flows. *Chemical Engineering Journal*, 308, 669-682.
- Erdemir, D., Lee, A. Y., & Myerson, A. S. (2009). Nucleation of crystals from solution: Classical and two-step models. *Accounts of Chemical Research*, 42(5), 621-629.

- Etzel, M. R. (2007). Bulk Protein Crystallization-Principles and Methods. Em *Process Scale Bioseparations for the Biopharmaceutical Industry* (pp. 159-178).
- Ewing, F., Forsythe, E., & Pusey, M. (1994). Orthorhombic lysozyme solubility. *Acta Crystallographica, D50*, 424-428.
- Ferreira, A., Rocha, F., Teixeira, J. and Castro, F. (2017). *Modular oscillatory flow plate reactor*. WO 2017/175207 A1.
- Forsythe, E. L., Judge, R. A., & Pusey, M. L. (1999). Tetragonal chicken egg white lysozyme solubility in sodium chloride solutions. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 44(3), 637-640.
- García-Ruiz, J. M. (2003). Nucleation of protein crystals. *Journal of Structural Biology*, 142, 22-31.
- Garrett, R. H., & Grisham, C. M. (2010). Proteins: Their Primary Structure and Biological Functions. Em *Biochemistry* (Fourth Edi, pp. 93-94). Mary Finch.
- Giegé, R. (2013). A historical perspective on protein crystallization from 1840 to the present day. *The FEBS Journal*, 280, 6456-6497.
- Groß, M., & Kind, M. (2016). Bulk Crystallization of Proteins by Low-Pressure Water Evaporation. *Chemical Engineering and Technology*, 39(8), 1483-1489.
- Heijna, M. C. R., Theelen, M. J., Van Enckevort, W. J. P., & Vlieg, E. (2007). Spherulitic growth of hen egg-white lysozyme crystals. *Journal of Physical Chemistry B*.
- Hekmat, D., Hebel, D., Schmid, H., & Weuster-Botz, D. (2007). Crystallization of lysozyme: From vapor diffusion experiments to batch crystallization in agitated ml-scale vessels. *Process Biochemistry*, 42(12), 1649-1654.
- Hernandes, A. (1988). Crescimento, caracterização e aplicação de monocristais de TGS em detetores de radiação na região do infravermelho. Universidade de São Paulo.
- Jancarik, J., & Kim, S. (1991). *Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins*. *J. Appl. Cryst*, 24, 409-411.
- Jongen, N., Donnet, M., Bowen, P., Lemaître, J., Hofmann, H., Schenk, R., ... Herguijuela, J. R. (2003). Development of a Continuous Segmented Flow Tubular Reactor and the “Scale-out” Concept - In Search of Perfect Powders. *Chemical Engineering & Technology*, 26(3), 303-305.
- Kramer, R. M., Shende, V. R., Motl, N., Pace, C. N., & Scholtz, J. M. (2012). Toward a molecular understanding of protein solubility: Increased negative surface charge correlates with increased solubility. *Biophysical Journal*, 102, 1907-1915.

- Krauss, I. R., Merlino, A., Vergara, A., & Sica, F. (2013). An overview of biological macromolecule crystallization. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 11643-11691.
- Kwon, J. S. Il, Nayhouse, M., Christofides, P. D., & Orkoulas, G. (2014). Modeling and control of crystal shape in continuous protein crystallization. *Chemical Engineering Science*, 107, 47-57.
- Kwon, J. S. Il, Nayhouse, M., Orkoulas, G., Ni, D., & Christoffides, P. D. (2015). Run-to-run-based model predictive control of protein crystal shape in batch crystallization. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 54(16), 4293-4302.
- Lee, E. K., & Kim, W.-S. (2003). Protein Crystallization for Large-Scale Bioseparation. Em *Isolation and Purification of Proteins* (pp. 277-320). Marcel Dekker, Inc.
- Lin, C., Zhang, Y., Liu, Y., Wang, X. (2017). Study on Nucleation Kinetics of lysozyme crystallization. *Journal of Crystal Growth*.
- Lu, J., Wang, X.-J., & Ching, C.-B. (2002). Batch crystallization of soluble proteins: Effect of precipitant, temperature and additive. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*, 45, 201-217.
- Lu, Q.-Q., Yin, D.-C., Liu, Y.-M., Wang, X.-K., Yang, P.-F., Liu, Z.-T., & Shang, P. (2010). Effect of mechanical vibration on protein crystallization. *Journal of Applied Crystallography*, 43, 473-482.
- Martins, P. ., Pessoa, J., Sàrkány, Z., Rocha, F., & Damas, A. (2008). Rationalizing Protein Crystallization Screenings through Water Equilibratio Theory and Protein Solubility Data. *Crystal Growth & Design*, 8(12), 4233-4243.
- Masy, J. C., & Cournil, M. (1991). Using a Turbidimetric Method to study the kinetics of agglomeration of potassium sulfate in a liquid medium. *Chemical Engineering Science*, 46(2), 693-701.
- McPherson, A. (2014). Introduction to protein crystallization. *Methods*, 34, 254-265.
- McPherson, A., & Gavira, J. A. (2014). Introduction to protein crystallization. *Acta Crystallographica*, F70, 2-20.
- McPherson, A., & Kuznetsov, Y. G. (2014). Mechanisms, kinetics, impurities and defects: Consequences in macromolecular crystallization. *Acta Crystallographica*, F70, 384-403
- Mersmann, A. (2001). *Crystallization Technology Handbook* (Second Edi). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Mullin, J. W. (2001). *Crystallization* (Fourth Edi). Butterworth-Heinemann.

- Murai, R., Yoshikawa, H. Y., Kawahara, H., Maki, S., Sugiyama, S., Kitatani, T., Adachi, H., Takano, K., Matsumura, H., Murakami, S., Inoue, T., Sasaki, T., Mori, Y. (2008). Effect of solution flow produced by rotary shaker on protein crystallization. *Journal of Crystal Growth*, 310, 2168-2172.
- Nagy, Z. K., & Aamir, E. (2012). Systematic design of supersaturation controlled crystallization processes for shaping the crystal size distribution using an analytical estimator. *Chemical Engineering Science*, 84, 656-670.
- Nagy, Z. K., & Braatz, R. D. (2012). Advances and New Directions in Crystallization Control. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 3(1), 55-75.
- Nanev, C. (2018). Peculiarities of Protein Crystal Nucleation and Growth. *Crystals*, 8, 422.
- Neugebauer, P., & Khinast, J. G. (2015). Continuous crystallization of proteins in a tubular plug-flow crystallizer. *Crystal Growth and Design*, 15 (3), 1089-1095.
- Parambil, J. V., Schaepertoens, M., Williams, D. R., & Heng, J. Y. Y. (2011). Effects of oscillatory flow on the nucleation and crystallization of insulin. *Crystal Growth and Design*.
- Reis, N. M. F. (2006). *Novel Oscillatory Flow Reactors for Biotechnological Applications*. Universidade do Minho.
- Rocha, F., Vicente, A., Ferreira, A., & Teixeira, J. (2015). *Apparatus for mixing based on oscillatory flow reactors provided with smooth periodic constrictions*. WO 2015/056156 A1.
- Rodrigues, C. (2016). *Cristalização avançada de moléculas biologicamente relevantes*. Porto.
- Saikumar, Glatz, C. E., & Larson, M. A. (1998). Lysozyme crystal growth and nucleation kinetics. *Journal of Crystal Growth*, 187(2), 277-288.
- Saleemi, A. (2011). Strategic feedback control of pharmaceutical crystallization systems. *Loughborough University's*.
- Sauter, A., Roosen-Runge, F., Zhang, F., Lotze, G., Feoktystov, A., Jacobs, R. M. J., & Schreiber, F. (2015). On the question of two-step nucleation in protein crystallization. *Faraday Discussions*, 179, 41-58.
- Schmidt, S., Havekost, D., Kaiser, K., Kauling, J., & Henzler, H.-J. (2005). Crystallization for the Downstream Processing of Proteins. *Engineering in Life Sciences*, 5 (3), 273-276.
- Smejkal, B., Helk, B., Rondeau, J. M., Anton, S., Wilke, A., Scheyerer, P., ... Weuster-Botz, D. (2013). Protein crystallization in stirred systems-scale-up via the maximum local energy dissipation. *Biotechnology and Bioengineering*, 1-8.
- Stevens, R. C. (2000). High-throughput protein crystallization. *Biophysical methods*, 10, 558-

563.

- Su, Q., Nagy, Z. K., & Rielly, C. D. (2015). Pharmaceutical crystallisation processes from batch to continuous operation using MSMPR stages: Modelling, design, and control. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 89, 41-53.
- Wagner, R. (2009). Protein crystallisation: an attractive alternative to protein purification. *Healthcare industry BW*, pp. 1-6.
- Weichsel, U., Segets, D., Thajudeen, T., Maier, E. M., & Peukert, W. (2017). Enhanced Crystallization of Lysozyme Mediated by the Aggregation of Inorganic Seed Particles. *Crystal Growth and Design*, 17(3), 967-981.
- Wiencek, J. (2002). Crystallization of Proteins. Em *Handbook of Industrial Crystallization* (Second Edi, pp. 267-284). Butterworth-Heinemann.
- Yang, H., Peczulis, P., Inguva, P., Li, X., Heng, J. (2018). Continuous protein crystallisation platform and process: case of lysozyme. *Chemical Engineering Research and Design*, 136, 529-535.
- Zhang, D., Xu, S., Du, S., Wang, J., & Gong, J. (2017). Progress of Pharmaceutical Continuous Crystallization. *Engineering*, 3(3), 354-364.

Anexo A - Solubilidade da lisozima

Tabela A-1. Solubilidade da lisozima a pH 4,6 nas concentrações de NaCl de 2,3,4,5 e 7 % (Forsythe et al., 1999).

Solubilidade de lisozima (g·L ⁻¹)					
T (°C)	2 %	3 %	4 %	5 %	7 %
20	28,2	8,6	3,06	1,96	1,24

Tabela A-2. Solubilidade da lisozima a pH 4,8 nas concentrações de NaCl de 2,3,4,5 e 7 % (Forsythe et al., 1999).

Solubilidade de lisozima (g·L ⁻¹)					
T (°C)	2 %	3 %	4 %	5 %	7 %
19,6	17,8	6,0	2,53	1,65	1,24
21,3	19,5	6,9	2,90	1,90	1,29

De modo a obter os valores de solubilidade a pH de 4,7 e a uma temperatura de 20 °C, foram realizadas interpolações e extrapolações, no caso de 0 e 1 %; os resultados obtidos, encontram-se na Tabela A-3

Tabela A-3. Solubilidade da lisozima a pH 4,7 e a 20 °C nas concentrações de NaCl de 0,1, 2,3,4,5,6 e 7 % (Forsythe et al., 1999).

Solubilidade de lisozima (g·L ⁻¹)								
T (°C)	0 %	1 %	2 %	3 %	4 %	5 %	6 %	7 %
20,0	54,79	38,99	23,20	7,41	2,84	1,83	1,52	1,20

Anexo B - Perfis de concentração

Ensaios com concentração de lisozima de $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$

Nas Figura B-1, Figura B-2, Figura B-3 são apresentados os perfis de concentração para as velocidades de 100, 200 e 300 rpm, respetivamente.

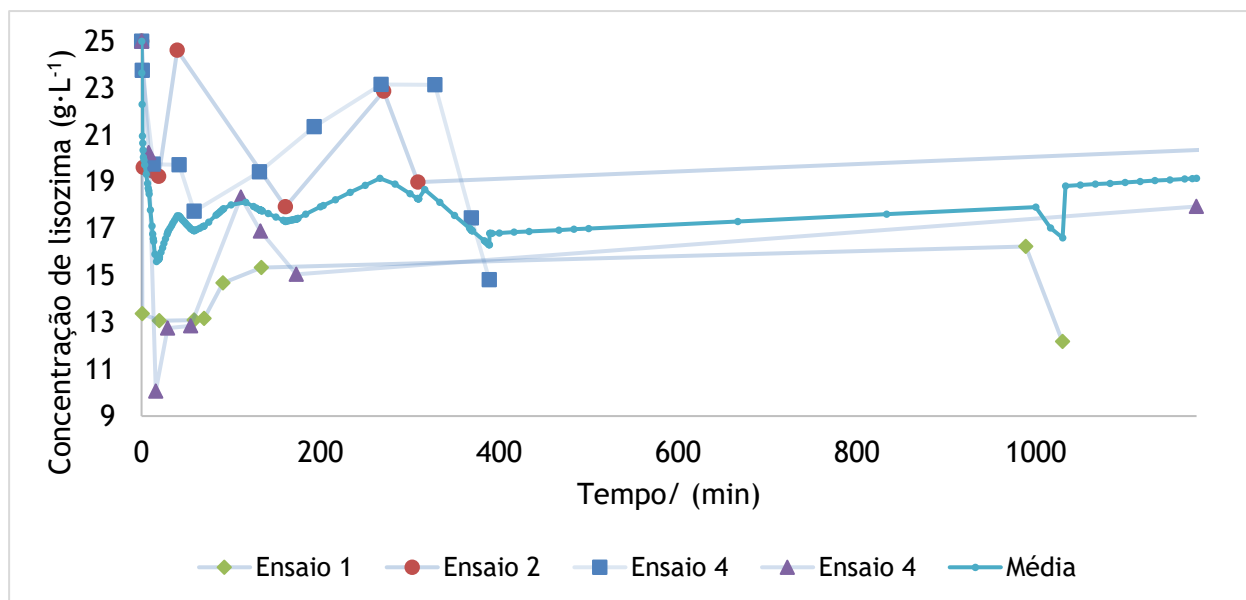


Figura B-1. Perfil de concentração para todos os ensaios realizados a 100 rpm e para uma concentração inicial de lisozima de $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

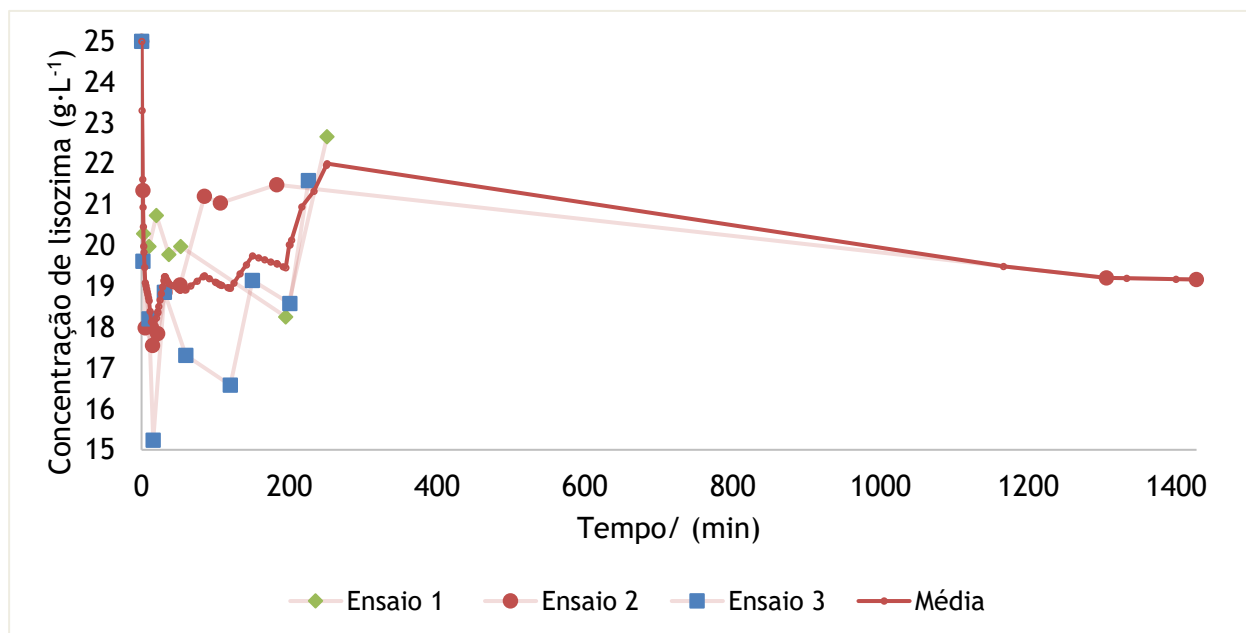


Figura B-2. Perfil de concentração para todos os ensaios realizados a 200 rpm e para uma concentração de lisozima inicial de $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

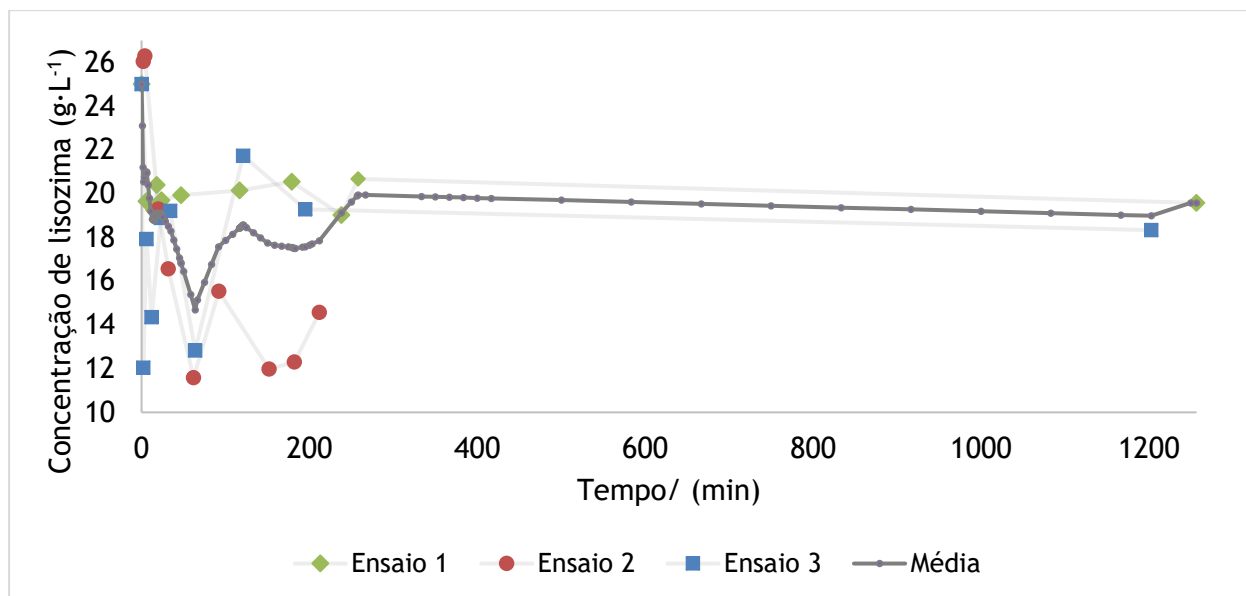


Figura B-3. Perfil de concentração para todos os ensaios realizados a 300 rpm e para uma concentração de lisozima inicial de 25 g·L⁻¹.

Ensaios com concentração de lisozima de 50 g·L⁻¹

Nas Figura B-4, Figura B-5, Figura B-6 são apresentados os perfis de concentração para as velocidades de 100, 200 e 300 rpm, respetivamente.

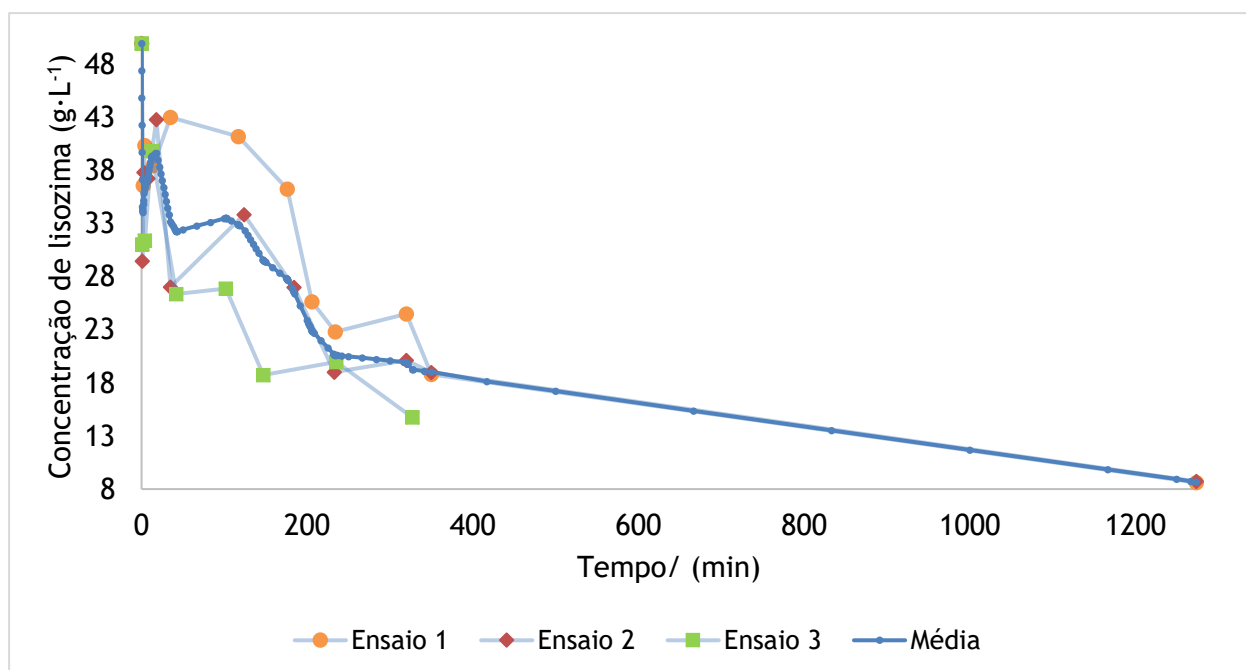


Figura B-4. Perfil de concentração para todos os ensaios realizados a 100 rpm e para uma concentração de lisozima inicial de 50 g·L⁻¹

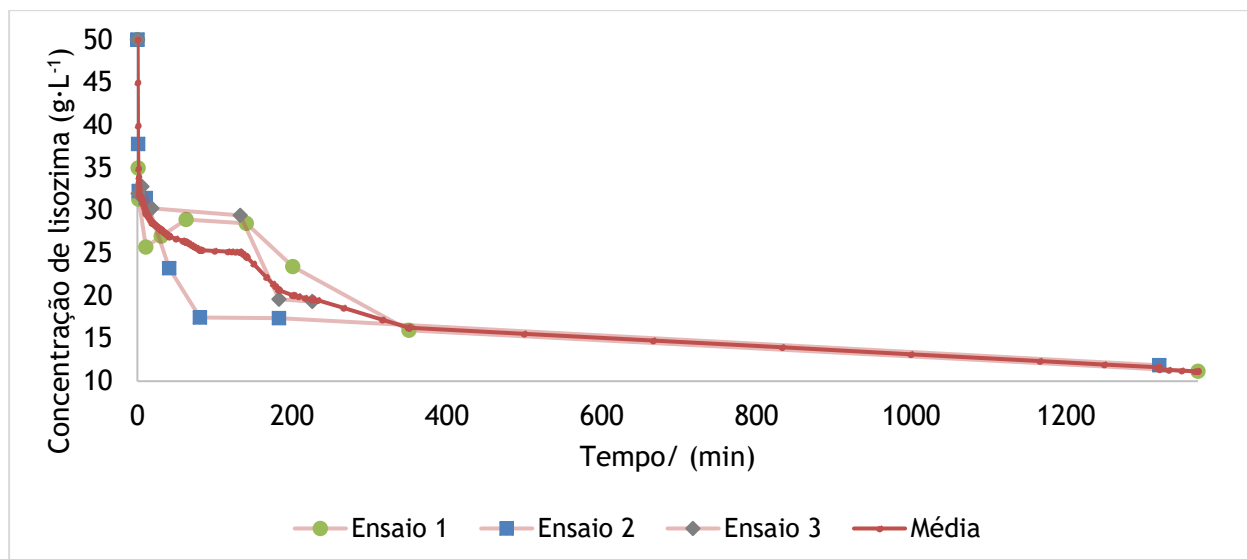


Figura B-5. Perfil de concentração para todos os ensaios realizados a 200 rpm e para uma concentração de lisozima inicial de $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$

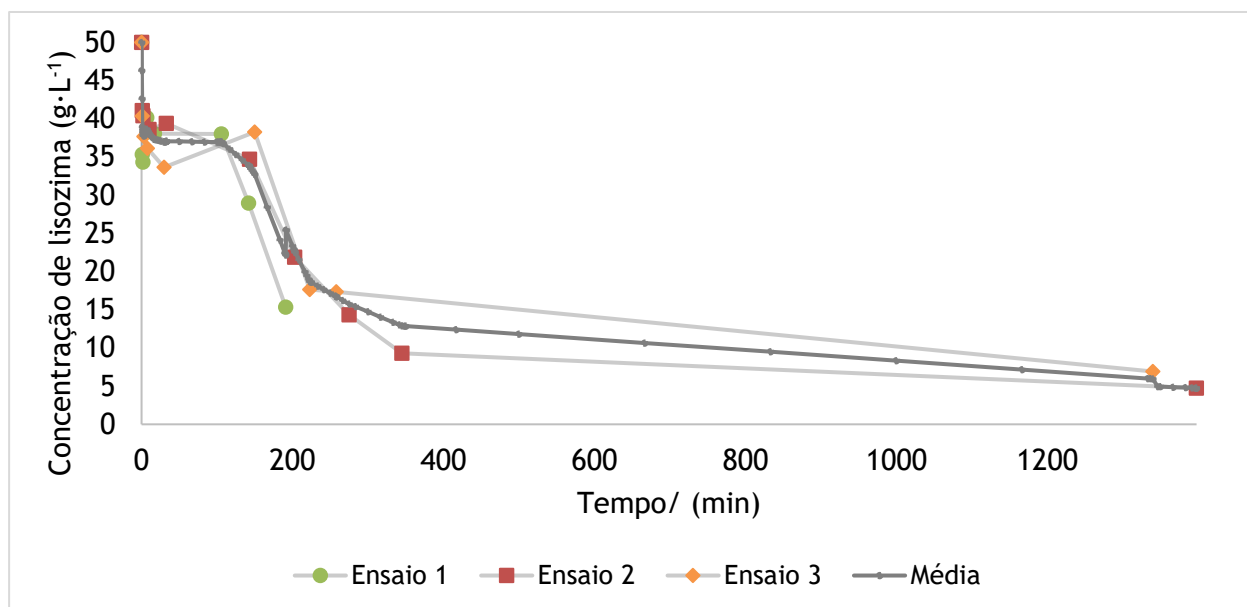


Figura B-6. Perfil de concentração para todos os ensaios realizados a 300 rpm e para uma concentração de lisozima inicial de $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

Anexo C - Tamanho dos cristais no tanque agitado

De modo a facilitar a visualização dos cristais, a seguir, encontram-se as imagens utilizadas nos gráficos, com uma dimensão superior.

Ensaios com concentração inicial de lisozima de $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$

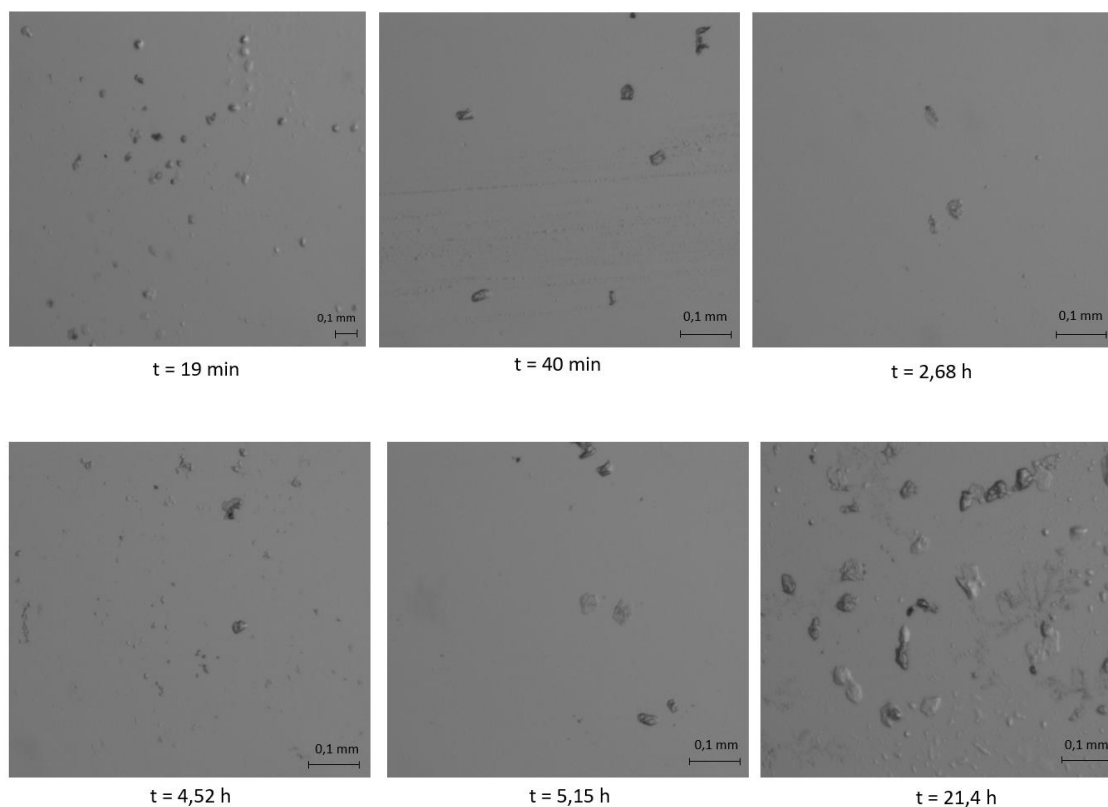


Figura C-1. Imagens referentes à velocidade de 100 rpm para diferentes tempos

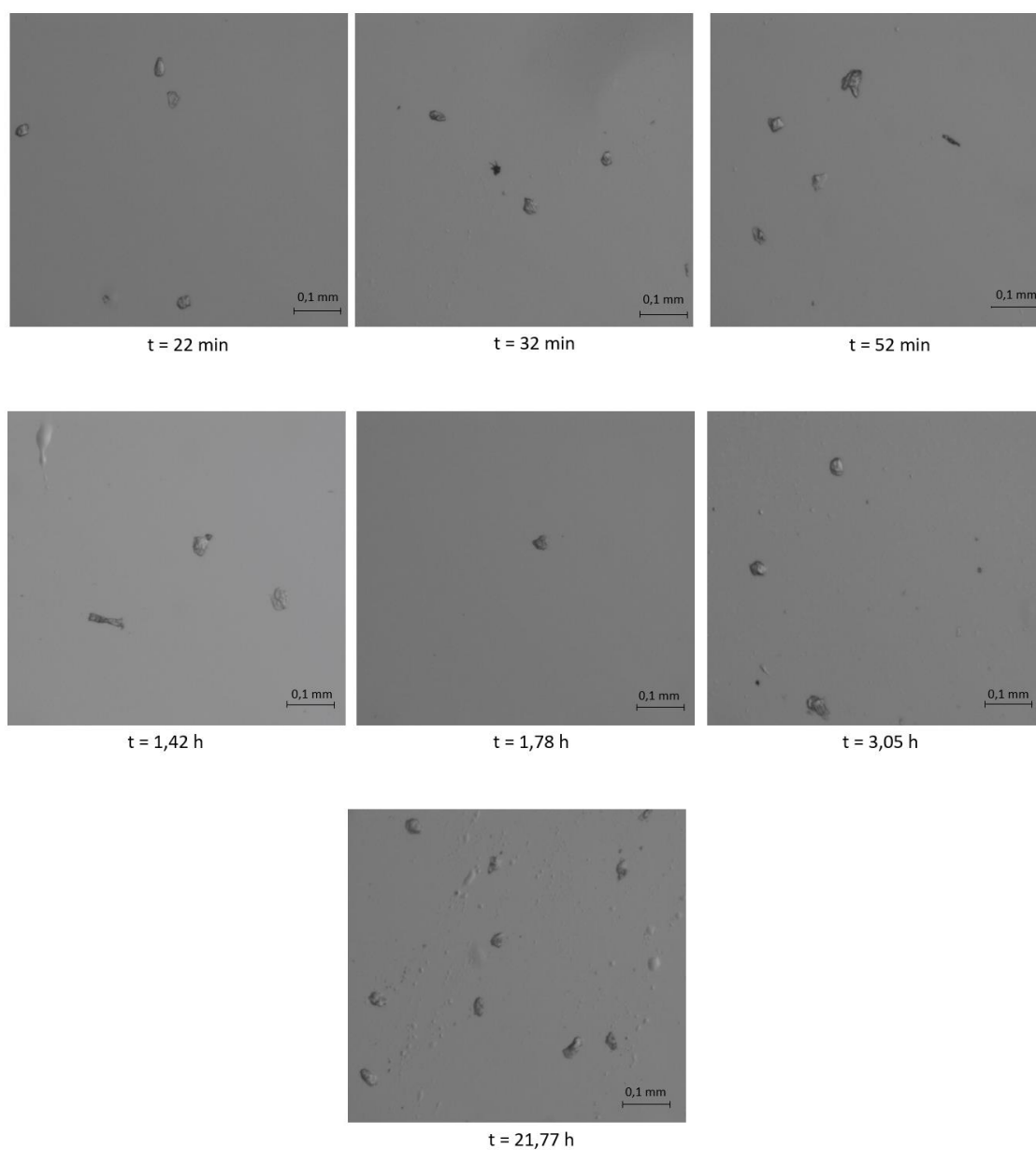


Figura C-2. Imagens referentes à velocidade de 200 rpm para diferentes tempos.

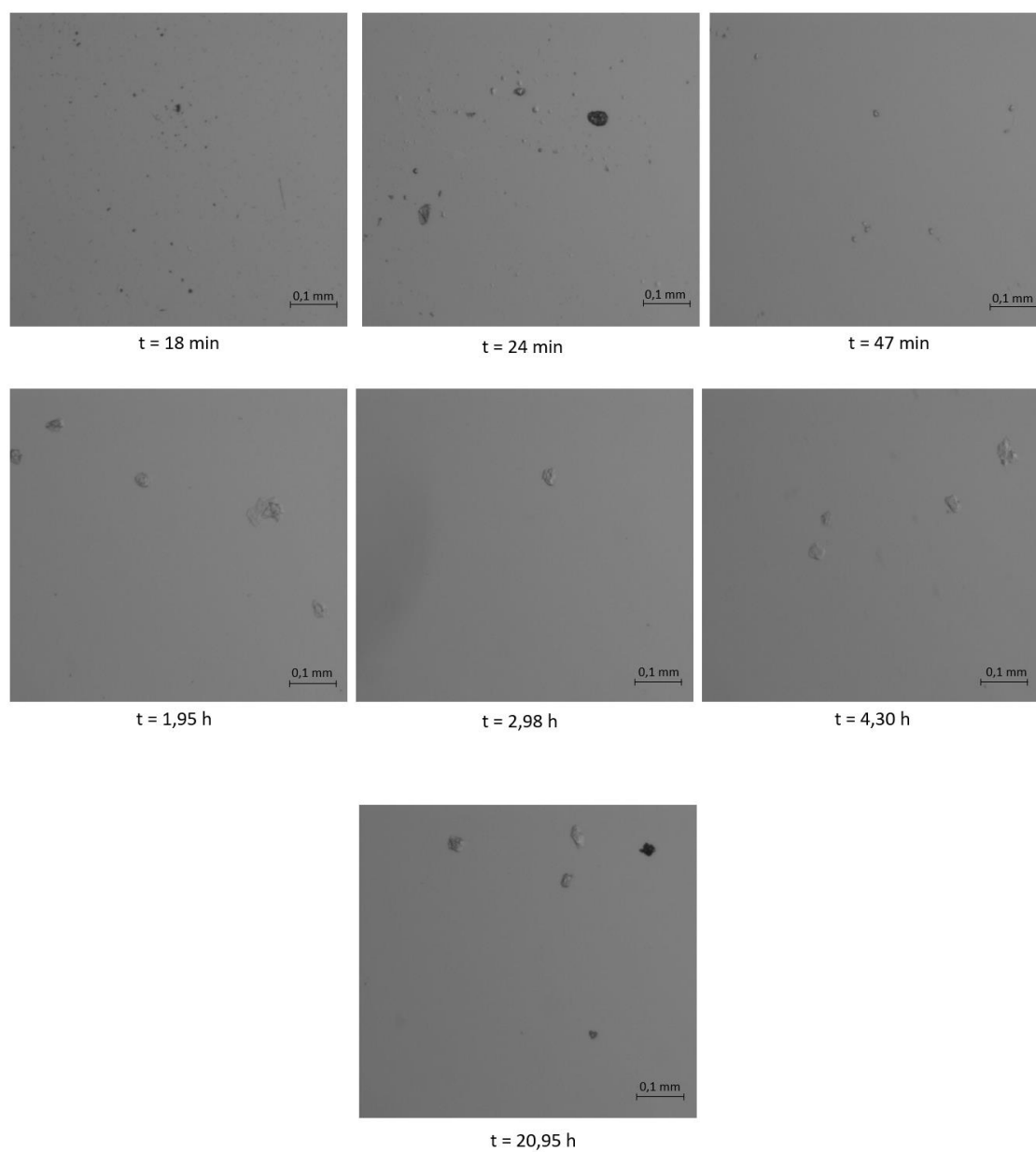


Figura C-3. Imagens referentes à velocidade de 300 rpm para diferentes tempos

Ensaio com concentração inicial de lisozima de $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$

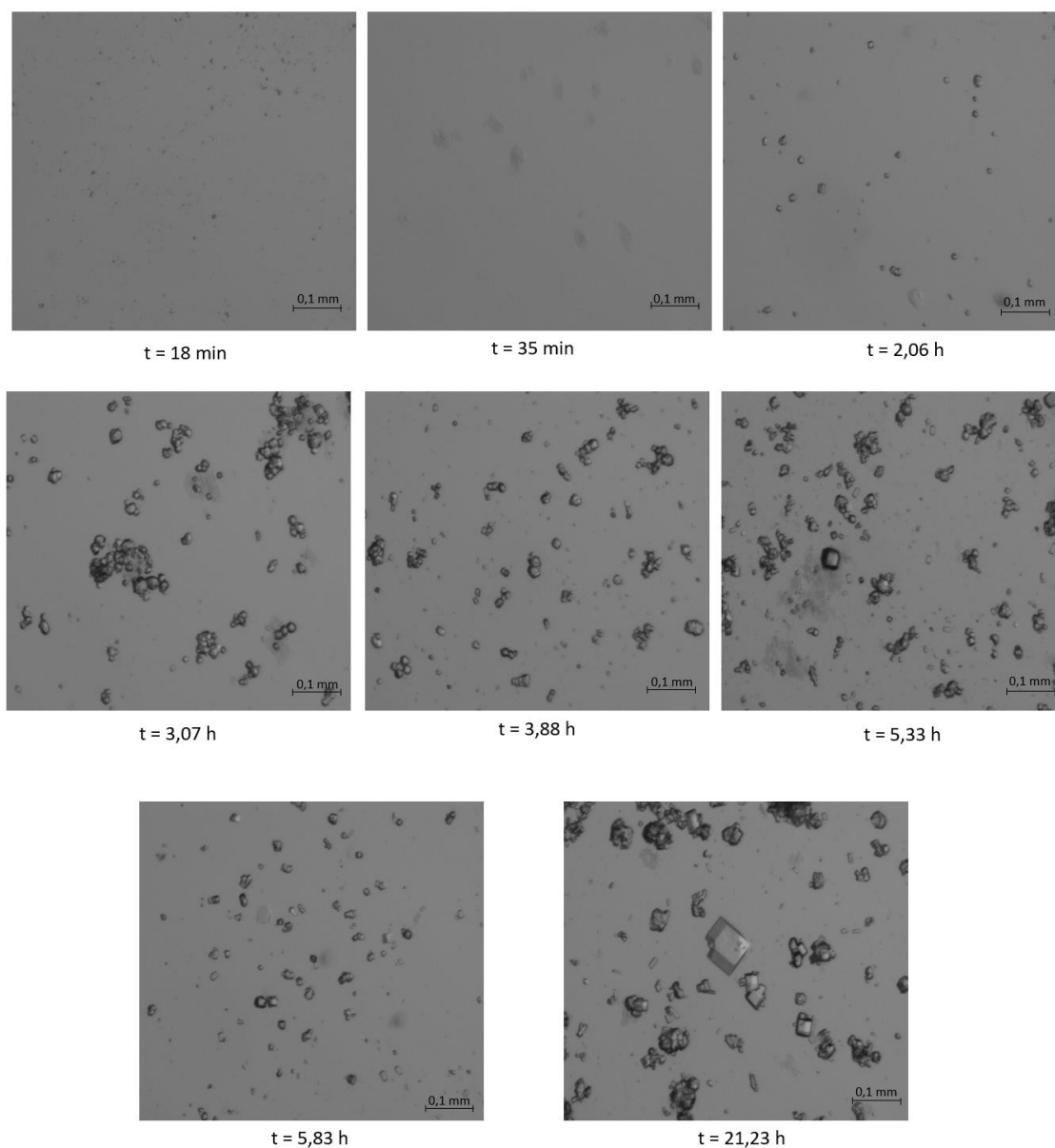


Figura C-4. Imagens referentes à velocidade de 100 rpm para diferentes tempos

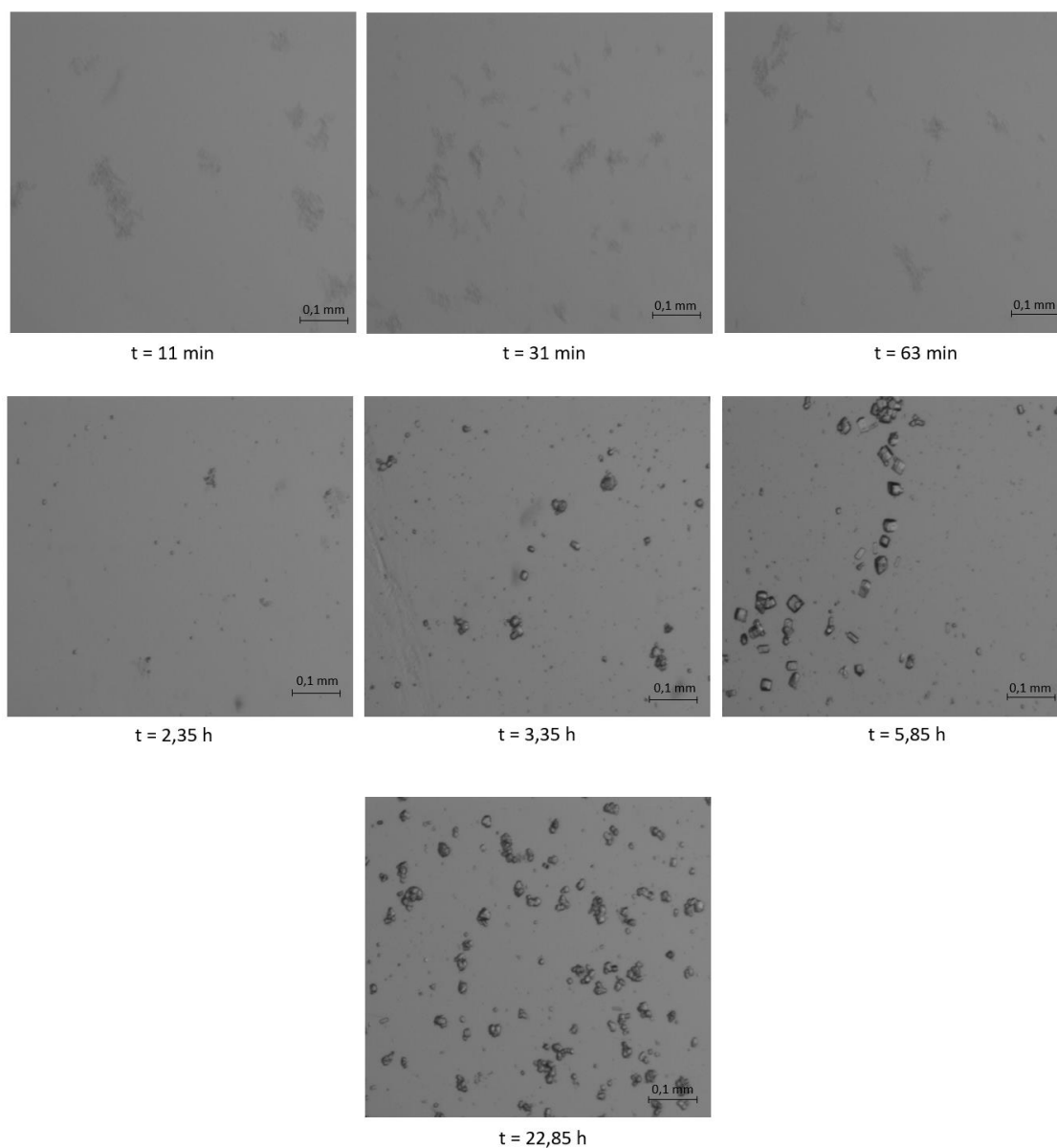


Figura C-5. Imagens referentes à velocidade de 200 rpm para diferentes tempos

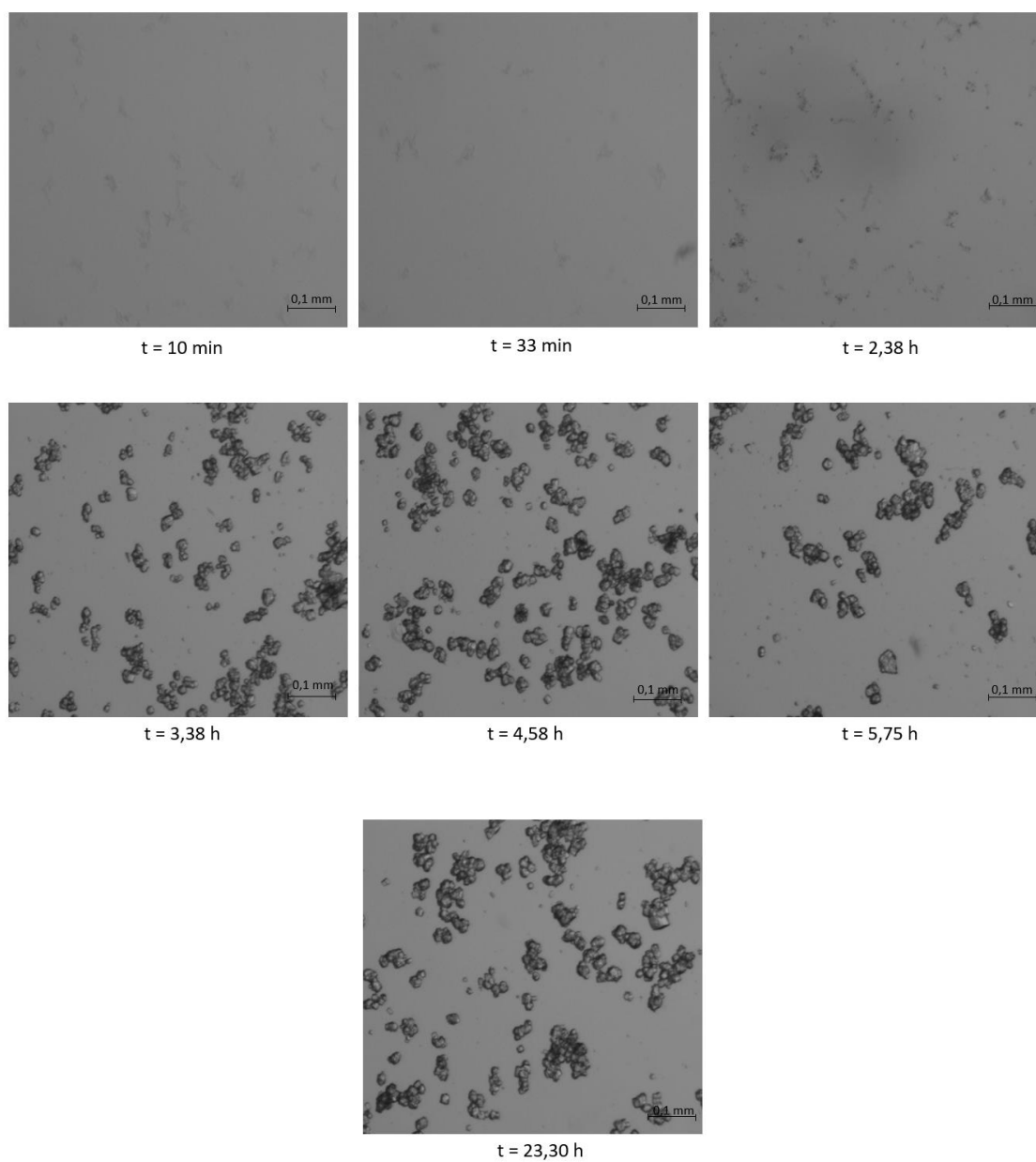


Figura C-6. Imagens referentes à velocidade de 300 rpm para diferentes tempos

Anexo D - Ondas Sinusoidais

Neste apêndice encontram-se todas as ondas sinusoidais aplicadas no reator de fluxo oscilatório, para uma frequência de 5 Hz. Na Figura D-1, é representada a onda sinusoidal correspondente a $x_0 = 1,0$ mm, que foi usada para três ensaios com concentração de lisozima de $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Por último, Figura D-2, é a onda sinusoidal correspondente a $x_0 = 2,0$ mm, que foi usada em ensaios para uma concentração de $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

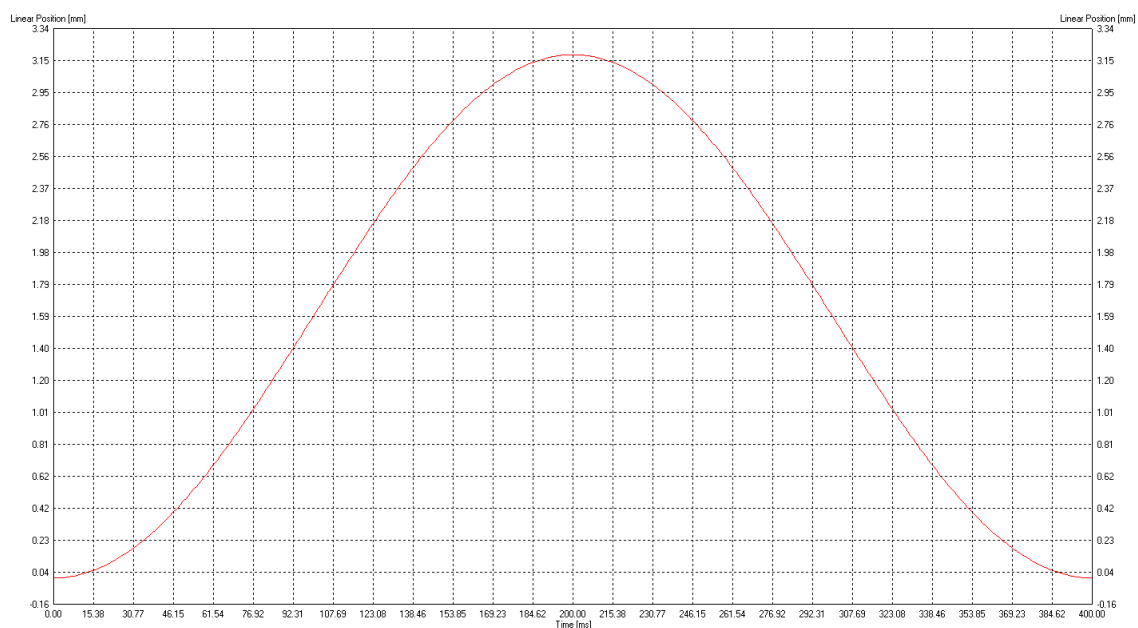


Figura D-1. Onda sinusoidal para $f = 5$ Hz e $x_0 = 1,0$ mm

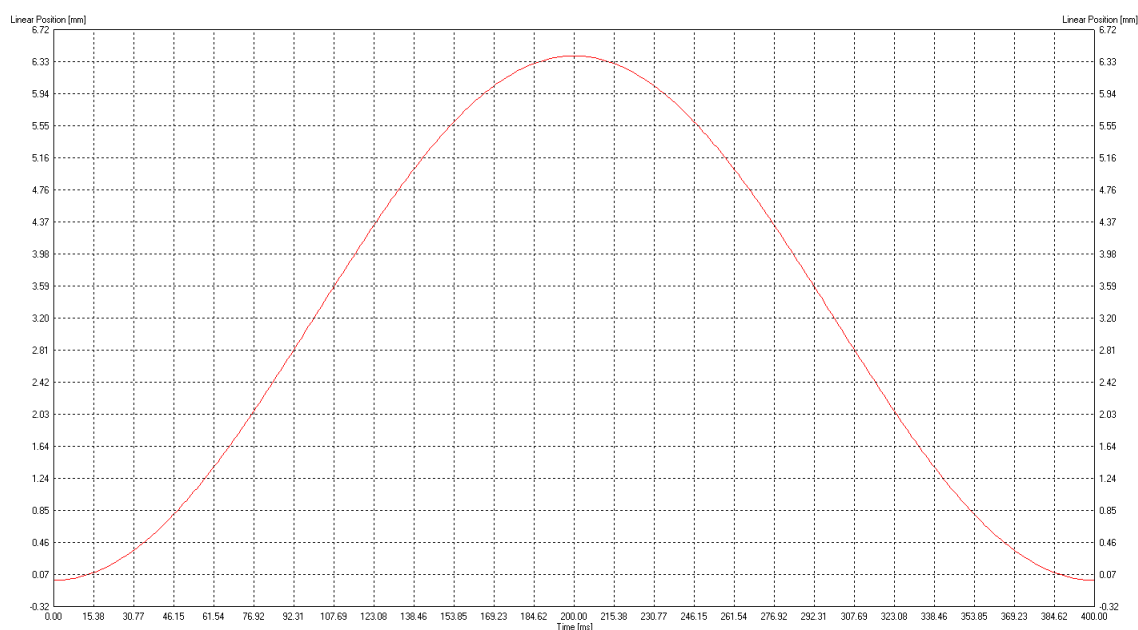


Figura D-2. Onda sinusoidal para $f = 5$ Hz e $x_0 = 2,0$ mm

Anexo E - Concentração e rendimento no RFO-CSP

Na Tabela E-1, encontram-se os valores obtidos para a concentração de lisozima final em todos os ensaios realizados, para uma frequência de 5 Hz e x_0 de 1 mm e 2 mm.

Tabela E-1. Concentração final obtida para os diferentes ensaios no RFO-CSP e o respetivo rendimento

	Ensaio	Concentração final ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Rendimento (%)
$x_0 = 1 \text{ mm}$	1	16,88	64,61
	2	23,56	42,83
	3	24,50	42,60
$x_0 = 2 \text{ mm}$	1	16,77	65,22
	2	11,93	82,63

Anexo F - Suspensão da solução no RFO-CSP



Figura F-1. Imagem do reator para $f= 5$ Hz e $x_0= 1,0$ mm



Figura F-2. Imagem do reator para $f = 5$ Hz e $x_0 = 1,0$ mm



Figura F-3. Imagem do reator para $f = 5$ Hz e $x_0 = 2,0$ mm



Figura F-4. Imagem do reator para $f = 5$ Hz e $x_0 = 2,0$ mm

Anexo G - Rendimento Tanque agitado para 203 minutos

Tabela G-1. Rendimentos do Tanque Agitado para a concentração inicial de $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, nos primeiros 203 minutos

Velocidade (rpm)	Concentração final ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Rendimento (%)
100	26,72	32
	23,92	49
	19,54	54
200	23,06	52
	17,27	74
	19,43	69
300	15,35	74
	21,86	53
	20,06	67